



Etude des voies de signalisation impliquées dans la sarcopénie : rôle du stress oxydant et de l'inactivité physique

Frédéric Derbré

► To cite this version:

Frédéric Derbré. Etude des voies de signalisation impliquées dans la sarcopénie : rôle du stress oxydant et de l'inactivité physique. Education. Université Rennes 2, 2011. Français. NNT : 2011REN20036 . tel-00652764

HAL Id: tel-00652764

<https://theses.hal.science/tel-00652764>

Submitted on 16 Dec 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE / UNIVERSITE RENNES 2 – UNIVERSIDAD DE VALENCIA
sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE RENNES 2

Mention : STAPS
Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Frédéric Derbré

Préparée au sein des laboratoires *Mouvement, Sport, Santé*
(EA1274, Rennes) et *Free Radical and Antioxidant Research*
Group (Valencia, Espagne)

Etude des voies de signalisation impliquées dans la sarcopénie

*Rôle du stress oxydant et de
l'inactivité physique*

Thèse soutenue le 21 novembre 2011
devant le jury composé de :

Xavier Bigard

Professeur agrégé du Val de Grâce, CRSSA - La Tronche / *rapporteur*

Stéphane Walrand

Directeur de recherche INRA - Laboratoire de Nutrition Humaine - Clermont-Ferrand / *rapporteur*

Marie-Agnès Giroux-Metgès

Maitre de conférences / HDR – Université de Bretagne Occidentale / *examineur*

Arlette Gratas-Delamarche

Professeur, Université Rennes 2 / *co-directeur de thèse*

José Viña

Professeur, Universidad de Valencia / *co-directeur de thèse*

Mari-Carmen Gómez-Cabrera

Maitre de conférences / HDR – Universidad de Valencia / *co-encadrant*

Ne rien faire est le bonheur des enfants et le malheur des vieux...

Victor Hugo

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	7
--------------------------	----------

REVUE DE LITTÉRATURE	11
-----------------------------------	-----------

Chapitre 1 : Qu'est ce que la sarcopénie ?.....	12
--	-----------

1. Controverses pour définir et considérer la sarcopénie	12
A. La sarcopénie : un syndrome gériatrique	12
B. Définir la sarcopénie : un véritable débat dans le domaine médical... ..	13
C. Une communauté scientifique qui se questionne également.....	14
D. L'inactivité physique : un facteur de risque de sarcopénie	15
E. Considérations méthodologiques pour étudier l'impact de l'inactivité dans la sarcopénie ...	16
2. Identifier la sarcopénie dans la recherche et la pratique	17
A. Evaluer la masse musculaire	17
B. Evaluer la force musculaire	19
C. Evaluer la performance physique	21
3. Caractéristiques de la sarcopénie	22
A. Effets de l'âge sur la structure et la fonction musculaire	22
B. Effets de l'inactivité sur la structure et la fonction musculaire	28
4. Pour résumer.....	30

Chapitre 2 : Comprendre les mécanismes de la sarcopénie pour mieux lutter	31
--	-----------

1. Mécanismes centraux à l'origine de la sarcopénie	31
A. Mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire	32
B. Mécanismes impliqués dans les altérations des qualités contractiles du muscle	42
C. Pour résumer... ..	43
2. Implications du stress oxydant dans la sarcopénie	44
A. Généralités sur le stress oxydant	44
B. Stress oxydant dans le muscle âgé et inactif	44
C. Potentiels rôles du stress oxydant dans les mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie	56
D. Pour résumer... ..	58

Chapitre 3 : PGC-1α, NF-κB et p38 MAPK : des protéines sensibles au stress oxydant impliquées dans la sarcopénie ?	59
---	-----------

1. Implications du Nuclear factor- κ B dans la sarcopénie	59
A. Généralités sur la voie de signalisation NF- κ B	59
B. Rôle des ERDO dans l'activation de NF- κ B	61
C. Rôles de NF- κ B dans le tissu musculaire	62
D. Pour résumer... ..	64
2. Implication de PGC-1 α dans la sarcopénie.....	65
A. Généralités sur PGC-1 α	65
B. Régulation de PGC-1 α dans le tissu musculaire	65
C. Rôle des ERDO dans l'activation de PGC-1 α	68
D. Rôles de PGC-1 α dans le tissu musculaire.....	69
E. Pour résumer... ..	73
3. Implications de la p38 MAPK dans la sarcopénie	74
A. Généralités sur la p38 MAPK	74
B. Rôle des ERDO dans l'activation de la p38 MAPK.....	74
C. Rôle de la p38 MAPK dans le tissu musculaire	76
D. Pour résumer	78

SYNTHESE ET OBJECTIFS	79
CONTRIBUTION PERSONNELLE	83
Chapitre 1 : Travaux expérimentaux.....	83
Etude n°1 : La réduction du stress oxydant induite par la xanthine oxydase limite l'atrophie musculaire et l'activation de NF-κB chez le rat immobilisé	84
Etude n°2 : Rôle des ERDO et de la myostatine dans la régulation des facteurs myogéniques au sein du tissu musculaire âgé	110
Etude n°3 : L'âge altère la réactivité de PGC-1α aux stimuli habituels et compromet la biogénèse mitochondriale en réponse à l'entraînement	130
Chapitre 2 : Discussion générale et perspectives de travail.....	152
1. L'inactivité musculaire stimule l'activité de la xanthine oxydase : implications dans le stress oxydant et la sarcopénie du muscle âgé.....	153
2. L'inactivité musculaire favorise l'activation de NF-κB dans le tissu musculaire : implications dans le développement de la sarcopénie	154
3. L'avance en âge induit un stress oxydant chronique : implications dans les altérations de la régénération musculaire et rôle potentiel de l'inactivité physique.....	155
4. L'avance en âge induit une perte de réactivité de PGC-1α : implications de l'inactivité chronique	156
5. La surproduction chronique d'ERDO : un frein physiologique pour les adaptations cellulaires dans le muscle âgé ?	157
A. Le paradoxe des ERDO	157
B. Une signalisation cellulaire altérée par la surproduction chronique d'ERDO	158
CONCLUSION	160
RESUMEN EN CASTELLANO	164
REFERENCES.....	176
ANNEXES.....	202
Chapitre 1 : Fiches techniques.....	202
Chapitre 2 : Liste des figures et tableaux	234
Chapitre 3 : Publications et communications	236

Liste des abréviations

$\dot{V}O_{2MAX}$	Consommation maximale en oxygène	GR	Glutathion réductase	OGG1	8-oxoguanine-DNA glycosylase
1O_2	Oxygène singulet	GSH	Glutathion réduit	OH°	Radical hydroxyle
3-NT	3-nitro-L-tyrosine	H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène	$ONOO^-$	Peroxynitrite
8-OHdG	8-oxo-déoxyguanosine	HSP	Heat shock protein	PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α
8-OHG	8-oxo-oxyguanosine	IGF-1	Insulin-like growth factor 1	RL	Radical libre
ADNmt	Acide déoxyribonucléique mitochondrial	IKK	I κ B kinase	SC	Cellules satellites
ADNn	Acide déoxyribonucléique nucléaire	IL	Interleukines	SCPT	Stair climb power test
AGP0I	Acides gras polyinsaturés	MAFBx	Muscle Atrophy F-box	SDH	Succinate déshydrogénase
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide	MAPK	Mitogen-activated protein kinase	SO	Stress oxydant
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -ribofuranoside	MDA	Malonedialdéhyde	SPPB	Short Physical Performance Battery
AIF	Apoptosis Inducing Factor	MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2	TBARS	ThioBarbituric Acid Reactive Substances
APAF-1	Apoptosis Protease Activating Factor 1	MHC	Chaîne de myosine lourde	TFAM	Mitochondrial transcription factor A
ARN	Acide ribonucléique	MKK	Kinase de MAPK	TNF- α	Tumor necrosis factor α
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1	MKKK	Kinase de MKK	Trx	Thiorédoxine
ATF2	Activating transcription factor 2	MnSOD	Manganèse Superoxyde dismutase	TUG	Get up and go
ATP	Adénosine triphosphate	MPO	Myelopéroxydase	UCP3	Uncoupling protein 3
CAMPK	Ca ²⁺ / calmodulin-dependent protein kinases II	MRF	Facteurs de regulation myogénique	XDH	Xanthine déshydrogénase
Caspases	Cysteine dependent aspartate cleaving proteases	MRF4	Myogenic Factor 6	XO	Xanthine oxydase
CAT	Catalase	Msr	Methionine sulfoxyde réductase	β -HAD	β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
CdK	Protéine Kinase cycline-dépendante	MuRF1	Muscle RING Finger-1		
COX	Cytochrome c oxydase	Myf5	Myogenic Factor 5		
CS	Citrate synthase	MyoD	Myogenic différenciation 1		
CSA	Surface de section transversale du muscle	NADH-TR	Nicotinamine adénine – dinucléotide tétrazolium réductase		
CuZnSOD	Cuivre Zinc Superoxyde dismutase	NADPH oxydase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase		
e^-	Electron	NF- κ B	Nuclear factor-kappaB		
EDL	Extenseurs des doigts longs	NIK	NF- κ B-inducing kinase		
EndoG	Endonucléase G	NO	Oxyde nitrique		
ERDA	Espèces réactives dérivées de l'azote	NO°	Monoxyde d'azote		
ERDO	Espèces réactives dérivées de l'oxygène	NOS	Oxyde nitrique synthase		
ETC	Chaîne de transport des électrons	NRF-1/2	Nuclear respiratory factors 1/ 2		
GH	Hormone de croissance	O ₂	Oxygène		
GPx	Glutathion peroxydase	O ₂ ^{°-}	Anion superoxyde		

INTRODUCTION

Fruit à la fois des progrès sociaux, sanitaires et technologiques, l'espérance de vie n'a cessé d'augmenter depuis le début du 19^{ème} siècle au sein des sociétés occidentales modernes. Entre 1900 et 2007, cette statistique en France est ainsi passée de 45 ans à 79 ans (moyenne hommes et femmes) (Stats INSEE, 2007) et désormais, les personnes âgées de plus de 70 ans constituent la tranche d'âge qui croît le plus rapidement dans les sociétés occidentales (Manton and Vaupel 1995). Les conséquences du vieillissement de la population sont généralement considérées comme catastrophiques sur les dépenses de santé publique. Mais plus que le vieillissement en lui-même, c'est davantage l'état de santé de cette population de plus en plus âgée qui explique la croissance des dépenses de santé publique. Les politiques publiques de santé visent donc à faire en sorte que cet allongement de l'espérance de vie se fasse dans les meilleures conditions possibles afin que l'individu continue de vivre sa vie de manière indépendante et surtout en bonne santé. L'espérance de vie en bonne santé, c'est-à-dire vivre sans limitation d'activité ou sans incapacités majeures, est ainsi devenue un indicateur complémentaire pour suivre l'état de santé de la population âgée. En France, celle-ci est de 62,1 et 64,2 ans, respectivement chez les hommes et les femmes (Stats INSEE, 2008). Cela signifie donc qu'il existe une période d'une quinzaine d'années en moyenne durant laquelle la personne âgée est considérée comme potentiellement plus **fragile**.

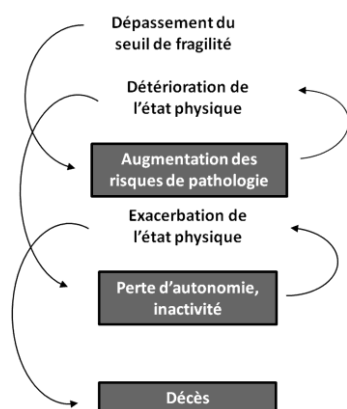


Figure 1. Spirale du déconditionnement

La fragilité est un syndrome gériatrique résultant d'une diminution des capacités physiques et cognitives de l'individu limitant les capacités de son organisme à répondre à un stress, même mineur (Fried et al. 2001). On considère que 10 à 20% des personnes âgées de 65 ans et plus sont fragiles, cette proportion atteignant 46% chez les plus de 85 ans. En ayant un organisme plus faible pour se défendre face à différents stress environnementaux, la personne âgée « fragile » va être davantage exposée à un grand nombre de pathologies. Ces pathologies vont progressivement l'affaiblir physiquement et la rendre encore plus faible. Ainsi, le syndrome de fragilité va entraîner la personne touchée dans une « **spirale du déconditionnement** » la conduisant à une perte d'autonomie, au

handicap, à la dépendance et finalement à la mort. Pour ces différentes raisons, la lutte contre le syndrome de fragilité constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur de santé publique.

L'un des facteurs principaux favorisant le développement du syndrome de fragilité est la diminution progressive de la masse et de la force musculaire qui s'opère avec l'avance en âge. Ce phénomène est appelé sarcopénie, ce terme dérivant des mots grecs sarx (chair) et penia (pauvreté) (Rosenberg 1997). De multiples facteurs sont impliqués dans le développement de la sarcopénie dont l'âge évidemment, un mauvais statut nutritionnel, les pathologies chroniques et l'inactivité physique. Parmi ces facteurs, l'inactivité physique semble jouer un rôle majeur et son impact risque d'être de plus en plus important dans un avenir proche. En effet, la tertiarisation du travail, le développement des modes de transport ou encore l'avènement de la culture de l'écran ont favorisé le développement d'une société inactive physiquement. Cet état d'inactivité chronique favorise la prévalence d'un grand nombre de maladies chroniques comme les maladies coronariennes, l'hypertension, le diabète de type II, le cancer, l'ostéoporose contribuant à titre d'exemple à 340000 décès précoces en 2000 aux Etats-Unis pour un coût estimé à 150 milliards de dollars par an (Walker et al. 2003). Indépendamment des maladies chroniques mentionnées précédemment, de plus en plus de preuves s'accumulent pour montrer que l'inactivité physique contribue également à accélérer l'apparition et le développement de la sarcopénie. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires expliquant l'impact de l'inactivité physique dans le développement de la sarcopénie demeurent encore mal connus. L'identification et la compréhension de ces mécanismes constitue pourtant un enjeu majeur pour une meilleure prise en charge de la sarcopénie.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'âge et de l'inactivité physique sur certains facteurs cellulaires et moléculaires pouvant jouer un rôle dans le développement de la sarcopénie. Nous avons tout particulièrement cherché à élucider le rôle du stress oxydant dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans la sarcopénie.

REVUE DE LITTÉRATURE

Chapitre 1 : Qu'est ce que la sarcopénie ?

1. Controverses pour définir et considérer la sarcopénie

A. La sarcopénie : un syndrome gériatrique

Il est désormais clairement établi que l'avance en âge est associée à une diminution progressive de la masse musculaire (Iannuzzi-Sucich et al. 2002; Doherty 2003). La notion de *sarcopénie* est apparue au cours des années 1990 pour qualifier ce phénomène, ce terme dérivant des mots grecs *sarx* (chair) et *penia* (pauvreté) (Rosenberg 1997). Par la suite, la sarcopénie fut plus spécifiquement définie comme la diminution progressive et généralisée de la masse musculaire se produisant avec l'avance en âge (Roubenoff and Hughes 2000). Néanmoins, ce concept n'est pas encore véritablement accepté dans le domaine médical. C'est pourquoi un grand nombre de chercheurs et cliniciens militent pour l'acceptation de la sarcopénie en tant que syndrome gériatrique afin de favoriser sa reconnaissance et une meilleure prise en charge des patients concernés (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Le terme de syndrome gériatrique réfère à une condition fréquente, complexe et coûteuse à l'origine de la détérioration de la santé chez les personnes âgées. La prise en compte de plusieurs critères est généralement utilisée pour considérer un ensemble de signes cliniques caractérisant un syndrome gériatrique. Ces critères incluent la prévalence de ces signes chez les personnes âgées, des causes plurifactorielles ainsi que les conséquences négatives que ces signes cliniques ont sur l'indépendance physique de l'individu. La sarcopénie est prévalente chez les populations âgées (Iannuzzi-Sucich et al. 2002; Chien et al. 2008) et possède de nombreuses causes interdépendantes comme le processus de vieillissement normal, mais aussi un style de vie sédentarisé, la malnutrition, les maladies chroniques ou encore certains traitements médicamenteux (Thompson 2007; Sayer et al. 2008). La sarcopénie est à l'origine d'une détérioration générale de l'état physique se traduisant par une augmentation du risque de chutes, d'une progressive incapacité à effectuer des activités basiques de la vie quotidienne, d'une perte d'autonomie, et conduit finalement à une réduction de l'espérance de vie (Goodpaster et al. 2006; Delmonico et al. 2007). Au regard de ces différents critères, il apparaît donc évident que la sarcopénie doit être considérée dans le domaine médical comme un véritable syndrome gériatrique.

B. Définir la sarcopénie : un véritable débat dans le domaine médical...

Sur le plan médical, le diagnostic de la sarcopénie reste encore difficile. Ce problème vient probablement de l'absence d'une définition clairement établie de la sarcopénie qui inclurait notamment des critères précis de diagnostic (Visser 2009). Sans définition, les probabilités de voir les médecins reconnaître et traiter de manière appropriée la sarcopénie demeureront faibles. Dans ce contexte, certains travaux ont proposé des critères basés sur l'utilisation de l'absorption bi-photonique à rayons X (DEXA) pour quantifier la masse musculaire. Ainsi, Baumgartner et al. (1998) ont avancé l'idée d'un index de masse musculaire (masse musculaire appendiculaire [kg]/taille² [m²]) inférieur à au moins deux écarts-type par rapport à celui d'une population de référence plus jeune pour diagnostiquer la sarcopénie. D'autres s'appuient sur l'utilisation d'un index basé sur la masse musculaire totale divisée par le poids de corps et multipliée par 100 (Goodpaster et al. 2006). Avec cette dernière définition, deux stades de sarcopénie sont considérés : un stade 1 lorsque l'index se situe de 1 à 2 écarts-type par rapport à celui d'une population de référence plus jeune, un stade 2 lorsque cet index est inférieur à 2 écarts-type (Goodpaster et al. 2006). En dépit de ces propositions, rares sont encore les études à grande échelle utilisant ces critères de diagnostic. Peu de cliniciens intègrent en effet la sarcopénie dans les bilans cliniques menés chez les patients âgés (Bauer and Sieber 2008). Cela peut s'expliquer en partie par le coût élevé de la DEXA employée pour calculer ces index. Le fait de prendre en compte seulement la masse musculaire pour le diagnostic de la sarcopénie, et non un paramètre fonctionnel est également critiquable. La mesure de la force musculaire ou bien d'une performance physique apparaissent en effet des paramètres essentiels dans le diagnostic de la sarcopénie, ces derniers reflétant les capacités physiques réelles de l'individu pour faire face aux demandes de la vie quotidienne. La mesure de la force de préhension, de la vitesse de marche ou de la vitesse de montées d'escaliers constituent autant de possibilités crédibles et complémentaires à la mesure de masse musculaire pour mener ce diagnostic.

Dans ce contexte confus, le Groupe de Travail Européen sur la Sarcopénie des Populations âgées (EWGSOP en anglais) réunissant un grand nombre de sociétés scientifiques et gériatriques en Europe a récemment proposé d'utiliser la masse et la force musculaire ainsi que la performance physique pour évaluer la sévérité de la sarcopénie. L'EWGSOP suggère d'utiliser 3 degrés conceptuels : la *présarcopénie*, la *sarcopénie* et la *sarcopénie sévère* (Cruz-Jentoft et al. 2010). La *présarcopénie* serait caractérisée par une faible masse musculaire sans réduction de la force musculaire ou de la performance physique. La *sarcopénie* serait quant à elle caractérisée par une diminution de la masse musculaire associée à une faible force musculaire ou une faible performance physique. La *sarcopénie sévère* serait identifiée lorsque les 3 critères de la définition sont atteints. La

reconnaissance de ces différents degrés de sarcopénie pourrait aider le clinicien à sélectionner des moyens d'interventions et de traitements appropriés.

C. Une communauté scientifique qui se questionne également...

En plus des difficultés rencontrées dans le milieu médical, l'absence d'une définition universelle de la sarcopénie est à l'origine de véritables débats dans la communauté scientifique. L'un des débats se situe autour du phénomène biologique associé à la sarcopénie : implique-t-il seulement l'atrophie musculaire comme classiquement proposé ? (Roubenoff and Hughes 2000) ou doit il prendre également en compte la fonction musculaire ? (i.e. la force et l'endurance musculaire) (Clark and Manini 2008; Visser 2009). Il est certain que la fonction musculaire est l'étape qui fait le lien entre la sarcopénie classiquement définie et les incapacités physiques qui lui sont associées (Clark and Manini 2010). Cependant, les partisans de la conception classique de la sarcopénie considèrent que les altérations de la force et de l'endurance musculaire sont uniquement imputables à l'atrophie musculaire. Néanmoins, cette conception omet la diminution avec l'âge de la force spécifique (i.e. force développée par rapport à la surface du muscle) qui souligne des altérations contractiles avec l'âge totalement indépendantes de l'atrophie musculaire (Doherty 2003).

A ce jour, la majorité des recherches s'intéressant à la sarcopénie s'est focalisée sur les modifications biologiques directement attribuables à l'âge chronologique en omettant de considérer l'impact du style de vie et des pathologies chroniques qui jouent probablement un rôle dans le développement de ce syndrome. Ainsi, les recherches sur la sarcopénie incluent généralement des sujets âgés en bonne santé pour s'assurer d'un protocole expérimental estimant seulement les effets du vieillissement. Pourtant, la prévalence de la sarcopénie est largement supérieure et son développement plus rapide chez les individus âgés au style de vie inadéquat ou affectés par des pathologies chroniques (Buford et al. 2010a). Le comportement (niveau d'activité physique, statut nutritionnel) et les pathologies chroniques constituent clairement des facteurs de risques. De plus en plus de chercheurs militent pour que ces facteurs soient reconnus, et cherchent à étudier l'impact de ces différents facteurs sur la sarcopénie (Buford et al. 2010a). Dans ce contexte, l'EWGSOP propose donc d'adopter les catégories de sarcopénie *primaire* et *secondaire* (Cruz-Jentoft et al. 2010). La sarcopénie serait dite « primaire » lorsqu'aucune cause évidente hormis l'âge ne peut être incriminée, alors qu'elle serait qualifiée de « secondaire » lorsqu'un ou plusieurs facteurs de risques peuvent être clairement identifiés comme responsable du développement de la sarcopénie (Tableau 1). Cette catégorisation, même si elle demeure encore imparfaite, permet d'envisager de nouveaux travaux de recherches basés sur une approche qui chercherait à isoler le rôle de chaque facteur pour mieux établir son implication dans la sarcopénie. Cette approche conduit à envisager des modèles expérimentaux de sarcopénie

accélérée exacerbant un facteur de risque pour pouvoir tester des nouvelles stratégies de prévention et de traitement. L'ensemble de ces travaux présenté dans ce document s'inscrit dans ce contexte. L'objectif est donc de contribuer à mieux préciser le rôle de l'inactivité chronique dans la sarcopénie du sujet âgé.

Tableau 1. Suggestions de catégorisation de la sarcopénie par l'EWGSOP (Cruz-Jentoft et al. 2010)

Sarcopénie primaire	
<i>Sarcopénie liée au vieillissement</i>	Aucune cause évidente hormis le vieillissement
Sarcopénie secondaire	
<i>Sarcopénie liée à l'inactivité</i>	Résulte d'une immobilisation, d'un style de vie sédentaire, d'un déconditionnement ou d'une situation d'apésanteur
<i>Sarcopénie liée à une maladie chronique</i>	Résulte d'une défaillance avancée d'un organe (cœur, poumons, foie, rein, cerveau), maladie inflammatoire, cancer ou maladie endocrinienne
<i>Sarcopénie liée à une malnutrition</i>	Résulte d'un apport inapproprié d'énergie et/ou en protéine lié à une mauvaise absorption, à des désordres gastro-intestinaux ou l'usage de substances médicamenteuses

D. L'inactivité physique : un facteur de risque de sarcopénie

De multiples facteurs sont donc impliqués dans le développement de la sarcopénie dont l'avance en âge, un mauvais statut nutritionnel, les pathologies chroniques et l'inactivité physique (Thompson 2007; Sayer et al. 2008). Parmi ces facteurs, l'inactivité physique semble jouer un rôle majeur et son impact risque d'être de plus en plus important dans un avenir proche. Depuis des milliers d'années et jusqu'à il y a peu de temps, le modèle de vie de nos ancêtres chasseurs-cueilleurs était la règle. Pour survivre et trouver la nourriture, toute la population était physiquement très active et ce dès le plus jeune âge. Depuis un siècle à peine (un espace de temps infime dans l'échelle de l'évolution), l'abondance relative de nourriture a progressivement conduit les populations occidentalisées à adopter un mode de vie sédentarisé où l'activité physique est considérablement réduite. Cette inactivité chronique est apparue trop soudainement pour permettre à notre génotype de s'adapter. Associée à une surconsommation de nourriture, elle a favorisé l'expansion des maladies comportementales, encore appelées sociétales, comme l'obésité, les maladies coronariennes, l'hypertension, le diabète de type II, le cancer, l'ostéoporose...L'impact socio-économique est considérable et malheureusement croissant. On estime en effet que ces pathologies contribuent à titre

d'exemple à 340000 décès précoces en 2000 aux Etats-Unis pour un coût estimé à 150 milliards de dollars par an (Walker et al. 2003). Indépendamment des maladies chroniques mentionnées précédemment, de plus en plus de preuves s'accumulent pour montrer que l'inactivité physique contribue également à accélérer l'apparition et le développement de la sarcopénie (Rosa et al. 2005; Aagaard et al. 2007; Kim et al. 2008).

E. Considérations méthodologiques pour étudier l'impact de l'inactivité dans la sarcopénie

Plusieurs approches expérimentales ont été développées pour explorer l'impact de l'inactivité dans la sarcopénie. L'une d'entre elles consiste à comparer une population âgée au mode de vie de sédentaire avec une population de même âge physiquement active depuis de nombreuses années (Aagaard et al. 2007; Buford et al. 2010b; Safdar et al. 2010). Chez le rongeur, cette approche se traduit par la comparaison de groupes de rongeurs vivant avec ou sans une roue d'activité dans leur cage durant toute leur existence. Malgré les intérêts de cette approche, peu de données sont pour le moment disponibles en raison de la complexité et de la lourdeur des protocoles expérimentaux (i.e. recrutement des sujets pour les études chez l'homme, longue durée des expérimentations chez le rongeur). Une seconde approche consiste à explorer l'inactivité de manière isolée pour comprendre l'effet qu'elle peut exercer seule sur le tissu musculaire. Suivant cette approche, l'inactivité est étudiée chez l'homme sur une courte période au niveau des muscles posturaux en explorant des sujets alités (i.e. bed rest), plâtrés ou qui doivent se déplacer avec une jambe immobilisée constamment suspendue (Pavy-Le Traon et al. 2007; Seynnes et al. 2008). Chez le rongeur, le modèle classiquement utilisé est celui de la queue suspendue où les pattes arrières de l'animal ne touchent plus le sol durant l'ensemble du protocole expérimental et ne subissent donc plus les effets de la pesanteur (Morey-Holton and Globus 2002). Cette approche présente l'avantage de pouvoir explorer sur une courte période les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'atrophie musculaire induite par l'inactivité, de tester des stratégies thérapeutiques et ce en limitant fortement les interactions avec d'autres conditions (âge, nutrition, pathologies). Aussi pertinente soit-elle, cette forme d'inactivité est quelque peu différente de celle qui est impliquée dans le développement de la sarcopénie. En effet, les différents modèles proposés génèrent une inactivité musculaire radicale et dont les effets sont très rapides. De plus, ces modèles inactivent quasiment toutes les fibres musculaires composant le muscle concerné (e.g. le soléaire pour le modèle de queue suspendue). A l'inverse, l'inactivité des populations dites sédentaires agit plus lentement et modérément sur la structure musculaire. Les individus continuent à solliciter une partie des fibres de leurs muscles (probablement les fibres dites oxydatives). Ces différences sont donc à prendre en compte dans l'interprétation des différents résultats de la littérature.

Pour éviter des confusions dans la suite de ce manuscrit, nous adopterons donc les termes d'*inactivité radicale* et d'*inactivité chronique* pour différencier ces deux approches.

2. Identifier la sarcopénie dans la recherche et la pratique

Pour diagnostiquer la sarcopénie et le degré de celle-ci, il convient de s'appuyer sur des indicateurs précis de masse et de force musculaire mais aussi de performance physique. L'une des problématiques actuelles est de déterminer ces différents paramètres de la manière la plus précise possible. Cette partie vise à donc à brièvement présenter les différentes techniques de mesures chez l'homme comme chez l'animal qui peuvent être mise en place pour diagnostiquer la sarcopénie.

A. Evaluer la masse musculaire

Un large panel de techniques peut être utilisé pour estimer la masse musculaire. Le coût, la disponibilité et la facilité de l'utilisation sont des critères à prendre en compte pour déterminer si la technique est plus appropriée pour la pratique clinique ou la recherche. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) liste l'ensemble de techniques existantes chez l'homme et le rongeur.

1. Imagerie médicale

Trois techniques d'imagerie médicale peuvent être utilisées pour estimer la masse musculaire ou la masse maigre d'un individu : la tomographie par ordinateur (CT scan), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'absorption bi-photonique à rayons X (DEXA). Le CT scan et l'IRM sont considérés comme des systèmes très précis permettant de différencier la masse grasse des autres tissus de l'organisme, ce qui font d'elles les techniques de référence dans le domaine de la recherche. Le coût élevé, l'accès limité à cet équipement dans certains sites hospitaliers ainsi que la prudence vis-à-vis des expositions aux radiations limitent l'usage de ces techniques d'imagerie dans le domaine de la pratique clinique (Chien et al. 2008). La DEXA constitue une méthode alternative pertinente à la fois pour la recherche et la pratique clinique et qui permet de distinguer la graisse du tissu osseux et de la masse maigre. Cette méthode présente également l'intérêt d'exposer à un niveau minimal de radiation. Néanmoins, cet équipement n'est pas portable, ce qui peut limiter son usage dans le cas d'études épidémiologiques à grande échelle (Chien et al. 2008).

Tableau 2. Mesures de la masse, de la force musculaire et de la performance chez l'homme et le rongeur (Altun et al. 2007; Cruz-Jentoft et al. 2010)

Paramètres mesurés	Homme	Rongeur
<i>Masse musculaire</i>	<ul style="list-style-type: none"> - CT scan - Imagerie par résonance magnétique (IRM) - Absorption bi-photonique à rayons X (DEXA) - Bio-impédancemétrie (BIA) 	<ul style="list-style-type: none"> - Pesée du muscle lors du sacrifice - CSA post mortem
<i>Force musculaire</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Flexion/extension du genou (Cybex) - Dynamomètre à poignet 	<ul style="list-style-type: none"> - Electrostimulation - Grip Strength Meter
<i>Performance physique</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Batteries de courts tests physiques (SPPB) - Vitesse de marche - Test « Timed get-up and go » - Test de montées de marche 	<ul style="list-style-type: none"> - Beam balance Test - Rod suspension - Test exploratoire

2. Bio-impédancemétrie

La bio-impédancemétrie (BIA) est une méthode qui estime le rapport des masses grasse et maigre. Ce type d'évaluation présente l'avantage d'être bon marché, facile d'usage, reproductible et approprié à la fois pour les patients ambulatoires et alités. Il a été montré que les valeurs obtenues par la BIA dans des conditions standardisées étaient très bien corrélées à celles obtenues par IRM (Janssen et al. 2000). Des équations de prédiction ont été validées pour des populations multiethniques et des valeurs de référence ont été établies pour des populations d'hommes et de femmes incluant les sujets âgés (Roubenoff et al. 1997; Janssen et al. 2000). On considère ainsi que la BIA est une bonne alternative à la DEXA pour la pratique clinique.

3. Mesures anthropométriques

Chez l'homme, des calculs basés sur la circonférence et l'épaisseur du pli cutané de la partie médiane du bras ont été utilisés pour estimer la masse musculaire dans le cadre ambulatoire. Il a également été montré que la circonférence du mollet était positivement corrélée avec la masse musculaire, certaines études montrant qu'une circonférence inférieure à 31 cm témoignait d'une incapacité physique (Rolland et al. 2003). Cependant, les modifications avec l'âge des dépôts adipeux ainsi que la perte d'élasticité de la peau contribuent à générer un certain nombre d'erreurs d'estimation chez les populations âgées. Finalement, peu d'études considèrent les mesures anthropométriques comme pertinentes chez les personnes âgées en raison du risque de confusion dans l'analyse de ces paramètres (Rolland et al. 2008).

Dans le cadre de travaux de recherche menés chez le rongeur, la masse d'un muscle est classiquement mesurée lors d'une pesée post-mortem. Dans ces études généralement transversales,

l'estimation de cette mesure anthropométrique constitue la méthode de référence pour l'étude de la sarcopénie.

B. Evaluer la force musculaire

La réduction de la masse musculaire a pour conséquence principale une diminution de la force musculaire, c'est-à-dire la capacité d'un muscle ou d'un groupe musculaire à produire une force maximale sur une brève durée. L'évaluation de ce paramètre constitue une approche complémentaire à la masse musculaire permettant de discriminer une population touchée par la sarcopénie. Cependant, la fatigue musculaire est aussi un paramètre qui devrait également être pris en compte dans le diagnostic de ce syndrome (Theou et al. 2008b). En effet, la fatigue musculaire, c'est-à-dire la capacité d'un muscle à produire une force soutenue sur une durée prolongée (Bautmans et al. 2007) semble être un indicateur complémentaire de la force musculaire. En effet, les activités de la vie quotidienne assurant l'indépendance d'une personne âgée ou inactive nécessitent de maintenir ou répéter des efforts musculaires sous-maximaux et plus rarement de produire un effort musculaire maximal (Petrella et al. 2005). L'estimation de la fatigue musculaire est néanmoins plus complexe car elle intègre une dimension temporelle pour réaliser une tâche motrice. Toutefois, même si la force et la fatigue sont fortement corrélées à la masse musculaire, une masse musculaire identique peut, d'un sujet à l'autre, produire des niveaux très variables de force et de fatigue. L'évaluation de la force ou de la fatigue musculaire ne peuvent donc en aucun cas se substituer à l'évaluation de la masse musculaire pour le diagnostic de la sarcopénie. Toutefois, une faible motivation ou toute autre condition limitant l'engagement du sujet lors de la passation du test peuvent induire une sous-estimation de ces paramètres. Leur interprétation est donc toujours sujette à discussion.

1. Force de préhension

Même si il serait plus pertinent de mesurer la force musculaire des membres inférieurs plutôt que celles des membres supérieurs, la force de préhension de la main est largement utilisée et bien corrélée avec d'autres indicateurs de la sarcopénie. Le faible coût, la disponibilité et la facilité d'utilisation participent à expliquer l'utilisation de cette méthode dans la pratique clinique et la recherche. Il a été démontré que la force de préhension maximale mesurée avec un dynamomètre en condition isométrique est fortement corrélée avec le couple de force de l'extension du genou et la coupe transversale de la surface du muscle du mollet (Lauretani et al. 2003). Une faible force de préhension maximale est ainsi considérée comme un marqueur clinique traduisant une faible mobilité (Lauretani et al. 2003). Il existe également une relation entre la force de préhension et les risques d'accidents dans les activités de la vie quotidienne (Al Snih et al. 2004). Quelques travaux ont également mesuré la fatigue musculaire lors d'une tâche de préhension sous maximale (temps de

maintien à 40% de la force maximale jusqu'à épuisement) mais ce type de mesure demeure encore marginalisé (Petrofsky and Laymon 2002). Comme la force de préhension est corrélée avec un grand nombre d'indicateurs de la sarcopénie, sa mesure est actuellement considérée comme un moyen rapide et efficace d'estimer la condition physique d'une population âgée.

2. Flexion/extension du genou

Chez l'homme, la force musculaire des membres inférieurs est généralement mesurée en condition isométrique ou isocinétique. L'évaluation de la force maximale isométrique peut être effectuée avec un équipement relativement simple. On la mesure généralement comme la force maximale appliquée au niveau de la cheville chez un sujet, assis et fixé sur un siège adapté, maintenant l'angle cuisse-mollet à 180° (Edwards et al. 1977). L'évaluation de la fatigue musculaire s'effectue en déterminant la courbe force-temps de maintien lors d'une contraction isométrique correspondant à un pourcentage donné de la force maximale (e.g. 40%). Le choix de l'isocinétisme apparaît néanmoins plus pertinent car cette condition reflète davantage la fonction musculaire dans le cadre des activités quotidiennes. Ainsi, des dynamomètres isocinétiques (e.g. Cybex) permettent désormais d'évaluer la force isométrique, isotonique et isocinétique, tout comme le couple de force concentrique développé à différentes angulations (Hartmann et al. 2009). Pour étudier la fatigue musculaire en condition isocinétique, aucun consensus n'est véritablement établi. Certaines études demandent au sujet de répéter des extensions du genou avec une force maximale jusqu'à ce que la force développée devienne inférieure à 50% de la force maximale. Le temps mis pour atteindre cette valeur constitue alors un indicateur de fatigue musculaire. D'autres considèrent que la différence de force développée entre la première et la 100^{ème} extension maximale constitue un index de fatigue (Lindstrom et al. 1997). Néanmoins, ces approches n'apparaissent pas fonctionnelles car elles exigent du sujet de réaliser constamment un effort maximal jusqu'à ce que la fatigue apparaisse, ce qui n'est pas une tâche réellement effectuée par des personnes âgées dans leur vie quotidienne. C'est pourquoi des études plus récentes commencent à évaluer la fatigue musculaire en condition isotonique, c'est-à-dire en mesurant la capacité à maintenir ou répéter le plus rapidement possible un exercice pour une force sous maximale donnée (McNeil and Rice 2007). Quelques données commencent à être disponibles chez les populations âgées concernant la force maximale et la fatigue musculaire des membres inférieurs en condition isotonique ou isocinétique (Neder et al. 1999; Goodpaster et al. 2001). Si l'isocinétisme apparaît approprié pour les travaux de recherche, son usage dans la pratique clinique demeure limité en raison de l'équipement spécifique et coûteux qu'il nécessite.

Chez le rongeur, certains appareils comme le Grip Strength Meter commencent à être progressivement utilisés pour estimer de manière fonctionnelle la force musculaire des pattes avant de l'animal. Cependant, la force et la fatigue musculaire sont plus généralement évaluées de manière

invasive. Plus précisément, le muscle est prélevé puis les extrémités tendineuses sont reliées à un dynamomètre et à deux électrodes. Un courant électrique adapté est ensuite envoyé afin de générer une stimulation tétanique maximale considérée comme la force maximale développable par le muscle. La fatigue musculaire est quant à elle estimée par la différence de force maximale développée par le muscle entre le début et 4 à 5 minutes de stimulation électrique (Ryall et al. 2007; Ljubicic et al. 2009). Ces approches chez l'animal présentent l'intérêt d'évaluer la force intrinsèque du muscle, indépendamment des facteurs nerveux.

C. Evaluer la performance physique

Plusieurs tests prévus spécifiquement pour des populations âgées permettent d'évaluer la performance physique: les plus couramment utilisés sont le *Short Physical Performance Battery* (SPPB) (batterie standardisée de courts tests physiques), les tests de vitesse de marche, le test *Get-up and go* (TUG) ou encore le *Stair climb power test* (SCPT). Ces tests de performance physique fournissent des données pratiques permettant de situer facilement l'individu dans des normes et de mettre en place un suivi longitudinal (Cruz-Jentoft et al. 2010).

Le test le plus couramment utilisé est le SPPB. Ce test permet d'évaluer l'équilibre, la marche, la force et l'endurance en examinant les capacités de l'individu à se tenir debout les pieds côte à côte, en décalé et l'un devant l'autre, à effectuer une marche sur 8 pas et à se lever et s'asseoir 5 fois d'affilée (Guralnik et al. 1994). Chaque épreuve permet d'obtenir un score de performance et l'addition des scores de tous les tests permet d'obtenir une performance globale. Un score inférieur à 8 est en faveur d'une sarcopénie (Guralnik et al. 2000) (Tableau 3). Des tests de vitesse de marche (Tests sur 4 ou 6 m, 15 pieds...) sont également utilisés (Guralnik et al. 2000). Selon des études menées sur des différentes cohortes de populations, une vitesse maximale inférieure à 0,8 m/s sur un test de 4 m ou de 1 m/s sur un test de 6 m est associée à une sarcopénie (Tableau 3). Le TUG est un test permettant de mesurer le temps nécessaire pour effectuer une série de tâches motrices basiques. Le sujet doit se lever d'une chaise, marcher sur une courte distance, faire demi-tour et revenir s'asseoir. Il permet une estimation de l'équilibre dynamique qui est évaluée sur une échelle allant de 1 à 5 (Mathias et al. 1986). Enfin, le SCPT permet d'estimer cliniquement la puissance des membres inférieurs (Bean et al. 2007). Le sujet doit effectuer la montée de 10 marches le plus rapidement possible. La puissance des membres inférieurs est ensuite calculée par rapport à la hauteur des marches, la vitesse de montée et normalisée avec le poids du sujet (Bean et al. 2007).

Tableau 3. Seuils de performance pour le diagnostic de la sarcopénie chez les personnes âgées

Test utilisé	Seuils de détection pour la sarcopénie	Etudes de référence
SPPB	- Score ≤ 8 (Le score maximum est de 12)	Le score de SPPB est la somme des scores de 3 tests : équilibre, vitesse de marche et test de la chaise. Chaque test fournit une note de 0 à 4 basée sur les données de l'Established Populations of Epidemiologic Studies of the Elderly (EPESE) (n = 6534) (Guralnik et al. 2000).
Vitesse de marche	- Test de marche sur 6 m Si la vitesse < 1 m/s - Test de marche sur 4 m Si la vitesse < 0,8 m/s	Basé sur l'analyse statistique des données de l'Health, Aging and Body Composition Study (Cesari et al. 2009). Basé sur une analyse statistique de Laurentani et al. (2003) (n=1030).
TUG	- Score ≤ 3	Basé sur l'étude de Mathias et al. (1986)

Chez le rongeur, un certain nombre de tests existe également pour évaluer la performance physique de populations âgées (Tableau 2). L'un d'entre eux consiste à mesurer le temps pendant lequel le rongeur peut rester en équilibre sur une étroite poutre (Beam Balance Test). Une significative réduction du temps de maintien sur la poutre est observée chez le rat à partir de 23-24 mois traduisant des altérations de l'équilibre de l'animal (Altun et al. 2007; Emerich et al. 2008). Pour estimer la force musculaire, on peut utiliser le test de suspension (*Rod suspension*) qui consiste à mesurer le temps pendant lequel le rongeur est capable de rester suspendu à une barre par les pattes avant à environ 1 m du sol (Spangler et al. 1994). Ce test semble constituer un indicateur pertinent pour le diagnostic de la sarcopénie primaire puisqu'une diminution du temps de suspension est observée chez le rat à partir de 22-24 mois (Spangler et al. 1994; Goettl et al. 2001). Il est également possible d'utiliser un test avec une grille inclinée de 60° sur laquelle le rongeur doit rester accroché le plus longtemps possible durant 30 min (Joseph et al. 1983). Ce test montre que l'endurance musculaire est altérée à partir de 24 mois chez le rat (Joseph et al. 1983; Spangler et al. 1994).

3. Caractéristiques de la sarcopénie

A. Effets de l'âge sur la structure et la fonction musculaire

1. Diminution de la masse musculaire

On considère qu'une diminution d'environ 40% de la surface de section transversale du muscle (CSA) s'opère entre 20 et 60 ans chez l'homme (Doherty et al. 1993; Vandervoort 2002). Les travaux portant sur le sujet s'appuient, pour la grande majorité, sur des données obtenues au niveau des membres inférieurs en utilisant les différentes techniques précédemment citées (Tableau 2). Via l'imagerie par ultrasons, Young et al. (1985) ont rapporté par exemple des réductions de 25 à 35% de

la CSA du quadriceps chez des hommes âgés en moyenne de 30 à 70 ans. Des résultats semblables sont observés par tomographie aussi bien dans le muscle quadriceps (Klitgaard et al. 1990) que dans le biceps et le triceps brachial (Rice et al. 1989; Klitgaard et al. 1990). Ces résultats sont également confirmés par des mesures de CSA effectuées directement sur le muscle post-mortem avec une diminution d'environ 40% chez des sujets âgés en moyenne de 20 à 80 ans (Lexell et al. 1988).

Les rongeurs, et tout particulièrement le rat, sont des modèles expérimentaux animaux particulièrement utilisés pour l'étude de la sarcopénie. Selon les espèces, on considère le rat comme âgé entre 18 et 30 mois (Hopp 1993). L'une des espèces les plus utilisées pour étudier la sarcopénie est la *Fischer 344 Brown Norway F1 hybrid* possédant une espérance de vie supérieure aux autres espèces de rats (environ 40 mois). Dans cette espèce, une diminution de 30 à 50% du poids du muscle gastrocnémien est observée entre 6 et 30 mois (Haddad and Adams 2006; Hofer et al. 2008; Marzetti et al. 2008b; Siu et al. 2008). L'espèce Wistar a également fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Une diminution importante de la masse musculaire y est observée dès 24 mois dans des muscles à typologie mixte tels que le gastrocnémien (Capel et al. 2004; Mosoni et al. 2004). Des diminutions significatives sont également rapportées dans cette espèce dans le muscle soléaire à partir de 28 mois (Mosoni et al. 2004; Degens et al. 2008).

La diminution de la masse musculaire avec l'avance en âge s'explique essentiellement par une perte de fibres musculaires qui touche à la fois les fibres de type I et II (Young et al. 1985; Aniansson et al. 1986; Lexell et al. 1988) (Encadré 1, page 25). Alors qu'une baisse de seulement 5% du nombre de fibres se produit entre 24 et 50 ans, une réduction de 30 et 40% est rapportée entre 50 et 80 ans (Aniansson et al. 1992). Cela aboutit à une réduction annuelle d'environ 1% de la surface globale de section du muscle au-delà de 50 ans (Kent-Braun and Ng 1999; Frontera et al. 2000b). Néanmoins, l'atrophie de la fibre musculaire, c'est-à-dire la diminution de son diamètre, est également incriminée pour expliquer la diminution de la masse musculaire liée à l'âge (Aniansson et al. 1986; Lexell et al. 1988; Lexell and Downham 1992). L'atrophie n'affecte pas de manière similaire tous les types de fibres musculaires. Ce sont en effet les fibres rapides de type II qui semblent être le plus affectées par l'avance en âge, avec une baisse de 20 à 60 % de leur calibre (Larsson et al. 1978; Essen-Gustavsson and Borges 1986; Lexell et al. 1988; Singh et al. 1999; Hikida et al. 2000) (Tableau 4). Ce phénomène semble lui-même différencié au sein des différentes fibres de type II avec des réductions plus importantes dans les fibres de type IIb/x comparées aux fibres de type IIa. (Aniansson et al. 1986; Coggan et al. 1992) .

Tableau 4. Réduction avec l'âge, exprimée en pourcentage, de la taille des fibres musculaires chez l'homme

	Âge (ans)	Pourcentage de variation (%)	
		Fibres type I	Fibres type II
Larsson et al. (1978)	22-65	-1	-25
Essen-Gustavsson et Borges (1986)	22-70	-15	-19
Lexell et al. (1988)	15-83	-1	-29
Hikida et al. (2000)	58-78	-24	-40
Singh et al. (1999)	72-98	+7	-60

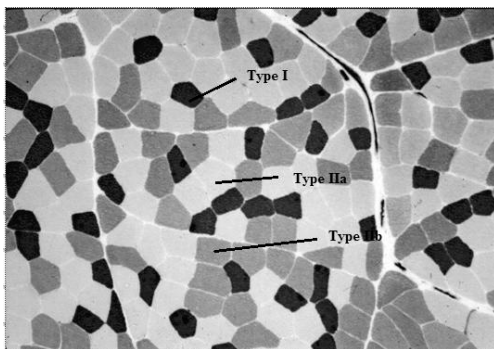
De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer l'atrophie des fibres musculaires des populations âgées. L'une des principales retenues concerne l'altération de la synthèse des protéines musculaires avec l'âge (Altérations du turnover protéique, page 37). Chez l'homme, elle surviendrait assez précocement dès la cinquantaine (Balagopal et al. 1997). Elle touche tout particulièrement les chaînes lourdes de myosine (MHC), essentiellement les isoformes MHCIIa et IIx dont la synthèse peut diminuer de 45% au delà de 75 ans (Balagopal et al. 1997; Balagopal et al. 2001; Hameed et al. 2003; Short et al. 2005). Ces modifications ont pour conséquence de modifier le profil typologique des différents groupes musculaires avec un ratio de fibres de type I qui devient plus important dans les populations âgées (Larsson et al. 1978; Lexell et al. 1988).

Encadré 1. Détermination de la typologie musculaire

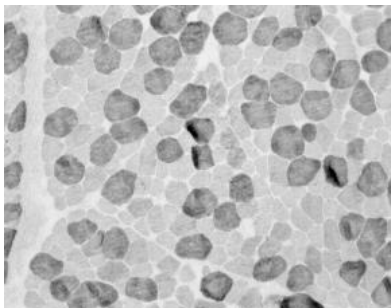
Les méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer la typologie musculaire sont basées sur le contenu en myosine, et plus spécifiquement sur les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC). En fonction de l'isoforme contenue dans la fibre musculaire, celle-ci aura une vitesse de contraction plus (MHC de type IIx) ou moins rapide (MHC de type I). Pour des raisons pratiques et physiologiques (propriétés mécaniques proches), on regroupe les 8 types de fibres existantes en 4 classes selon le schéma suivant :

- Type I Fibres de type I → Fibres lentes
- Type hybride Fibres de type IM et IIC → Fibres intermédiaires
- Type II Fibres de type IIA, IIX ou IIAX → Fibres rapides
- Type NéoAtrial Fibres de type néonatal, atrial, néoatrial et autres

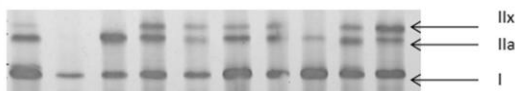
Les différentes méthodes utilisées pour estimer la typologie d'un muscle squelettique striée sont les suivantes :



Marquage histoenzymologique par l'ATPase myofibrillaire : Les activités oxydatives des fibres sont mises en évidence par l'action de la nicotinamine adénine-dinucléotide tétrazolium réductase (NADH-TR) et par l'activité ATPasique de la myosine à pH 9,40 et 4,35. Ces colorations autorisent un typage des fibres musculaires qui apparaissent plus ou moins claires en fonction du pH d'incubation.



Immunomarquage : L'immunomarquage sur coupes sériées est une méthode permettant d'analyser la typologie des fibres musculaires grâce à des anticorps spécifiques reconnaissant les différentes isoformes de MHC.



Etude des isoformes de MHC par électrophorèse : L'électrophorèse des protéines permet de séparer les différentes isoformes de MHC dans un gel de polyacrylamide. Ainsi, comme la myosine de type I est la plus légère, elle migre plus rapidement que les autres isoformes. Comme la myosine de type IIx est la plus lourde, elle migre moins rapidement que les autres isoformes.

2. Diminution de la force musculaire

La diminution de la force musculaire est un des critères essentiels pour identifier la sarcopénie. La force musculaire des extenseurs du genou est importante à considérer en raison de son importance fonctionnelle (Doherty 2003). En moyenne, le pic de force musculaire est réduit de 20 et 40% entre 20 et 70-80 ans (Larsson et al. 1979; Murray et al. 1985; Young et al. 1985) (Tableau 5). Des résultats du même ordre sont observés pour d'autres groupes musculaires comme les fléchisseurs de l'épaule et du poignet (McDonagh et al. 1984; Bassey and Harries 1993). Des diminutions plus importantes (jusqu'à 50%) sont néanmoins rapportées chez des sujets âgés de plus de 90 ans (Murray et al. 1980; Murray et al. 1985). La diminution de force musculaire semble s'accélérer tout particulièrement entre 60-70 ans. Des études longitudinales observent ainsi une réduction de 30 à 40% du pic de force des extenseurs du genou et de l'épaule entre 60 et 70 ans (Aniansson et al. 1986; Frontera et al. 2000a; Hughes et al. 2001).

Tableau 5. Modifications avec l'âge de la force musculaire des muscles extenseurs.

Etudes	Genre	Age (année)	Régime musculaire testé	% de la force musculaire
Larsson et al. (1979)	H	70	Isométrique	75
Murray et al. (1985)	H	80-90	Isométrique	55
Murray et al. (1980)	F	80-90	Isométrique	63
Young et al. (1984)	F	80	Isométrique	65
Young et al. (1985)	H	70	Isométrique	61
Overend et al. (1992)	H	70-80	Isométrique	76
Ivey et al. (2000)	H	70-80	Isométrique	76
	F	70-80	Isométrique	75
Poulin et al. (1992)	H	70-80	<i>Isocinétique (90°/s)</i>	
			Concentrique	68
			Excentrique	81
			<i>Isocinétique (180°/s)</i>	
			Concentrique	69
Vandervoort et al. (1990)	F	70-80	Excentrique	98
			<i>Isocinétique (90°/s)</i>	
			Concentrique	50
Lynch et al. (1999)	H	80	Excentrique	64
			<i>Isocinétique (90°/s)</i>	
			Concentrique	65
	F		Excentrique	67
			Concentrique	69
			Excentrique	73

Le pourcentage de la force musculaire fait référence à la force musculaire développée par les sujets âgés comparés à des sujets jeunes. H : homme / F : femme

L'avance en âge peut aussi affecter la fatigue musculaire. Cependant, la fatigue de nombreux groupes musculaires de personnes jeunes comme âgées a été évaluée sans qu'un véritable consensus soit véritablement établi. En effet, certaines études ont observé que les personnes âgées exhibaient moins de fatigue que leurs jeunes homologues pour des contractions isométriques ou isocinétiques (Hakkinen 1995; Hunter et al. 2005; Yassierli and Nussbaum 2007) alors que d'autres n'observaient

aucune différence (Allman and Rice 2001; Lanza et al. 2004; Theou et al. 2008a). Ces résultats pourraient s'expliquer à la fois par les forces maximales en absolu plus faible développé par les sujets âgés dans ce type d'exercice (Yassierli and Nussbaum 2007), mais également par l'atrophie sélective des fibres de type II observée durant le processus de vieillissement (Diminution de la masse musculaire, page 22). Les études en condition isotonique sont moins nombreuses mais rapportent quant à elles une augmentation de l'ordre de 10% la fatigue musculaire avec l'âge (Hunter et al. 2005; McNeil and Rice 2007). Les divergences entre tous ces travaux peuvent s'expliquer à la fois par les protocoles d'exercices utilisés (type et durée de contraction, groupes musculaires sollicités) et les populations évaluées (âge, sexe, niveau d'activité physique). Davantage de travaux apparaissent nécessaires pour éclaircir les effets de l'âge sur la fatigue musculaire.

Chez le rongeur, la force musculaire est communément évaluée de manière invasive (Evaluer la force musculaire, page 19). Une diminution de la force maximale avec l'avance en âge est constatée, mais l'apparition de ce phénomène semble différer selon l'âge et l'espèce étudiée. Ainsi, chez les rats *Fischer 344 Brown Norway F1 hybrid*, une diminution de la force maximale est généralement observée entre 32 et 36 mois à la fois dans les muscles soléaire, gastrocnémien et extenseur des doigts longs (EDL) (Brooks and Faulkner 1988; Ryall et al. 2007; Thomas et al. 2010). Chez des rats Wistar, Larsson et al. (1986) ont démontré que la force maximale diminuait dès 24 mois dans le muscle soléaire mais qu'elle demeurerait inchangée dans l'EDL. Tout comme chez l'homme, les travaux s'intéressant aux effets de l'âge sur la fatigue musculaire rapportent des résultats contradictoires. Ainsi, Ljubicic et al. (2009) observent une réduction plus importante avec l'âge de la force maximale du tibial antérieur après un protocole de fatigue alors que d'autres travaux ne rapportent aucune différence avec l'âge (Ryall et al. 2007).

B. Effets de l'inactivité sur la structure et la fonction musculaire

1. Diminution de la masse musculaire

Il n'existe pas encore d'approche expérimentale véritablement appropriée pour comprendre dans quelles mesures l'inactivité est impliquée dans la sarcopénie. Néanmoins, les modèles d'inactivité radicale apportent des données intéressantes. La majorité des études évaluant les effets de l'inactivité chez l'homme mènent leurs recherches sur des sujets alités (Pavy-Le Traon et al. 2007) ou qui doivent se déplacer avec une jambe immobilisée, constamment suspendue (Jones et al. 2004; Seynnes et al. 2008). Dans ce cadre, une diminution d'environ 10% de la CSA du quadriceps est observée après 3 semaines d'alitement ou 14 jours de suspension de la jambe (Funato et al. 1997; Kawakami et al. 2000; Jones et al. 2004; Seynnes et al. 2008). Celle-ci peut atteindre 18% après 17 semaines d'alitement (LeBlanc et al. 1992). Chez le rat, le modèle le plus utilisé pour créer une situation d'inactivité est celui de la queue suspendue (Morey-Holton and Globus 2002) (Figure 2). Appliqué communément sur une période de 14 jours, ce modèle permet d'obtenir une atrophie d'environ 50% du muscle soléaire (Servais et al. 2007; Oishi et al. 2008) et d'environ 25% du muscle gastrocnémien (Hofer et al. 2008). Ce modèle de queue suspendue est plus difficilement exploitable chez la souris en raison de leur activité et de leur agilité spontanées. Pour cette raison, Caron et al. (2009) ont récemment proposé un modèle basé sur l'immobilisation de la patte en position fléchie chez la souris et ont obtenu en 14 jours une atrophie de 33% du tibial antérieur et de 12% du gastrocnémien (Figure 2).

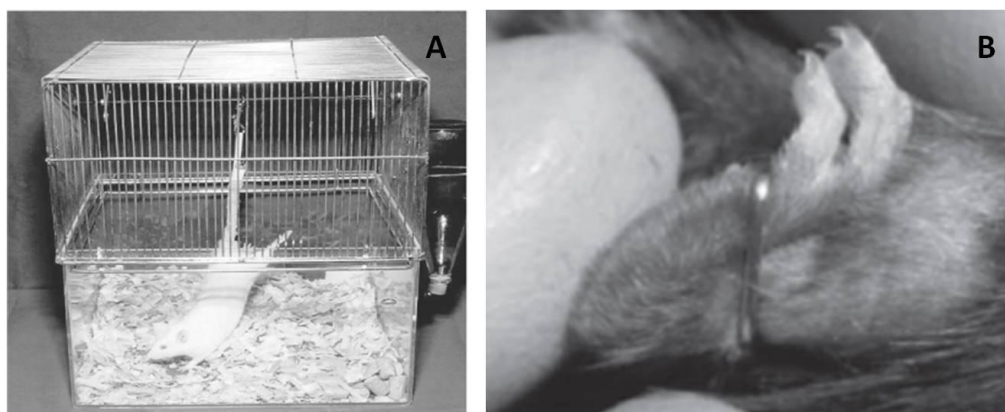


Figure 2. Modèle d'immobilisation chez les rongeurs : queue suspendue (A) et immobilisation de la patte (B)

La réduction de la masse musculaire due à l'inactivité radicale s'explique principalement par une atrophie des fibres de type I et IIa (Allen et al. 1996; Fitts et al. 2000; Baldwin and Haddad 2001). Néanmoins, contrairement aux effets de l'avance en âge, les fibres de type I semblent davantage affectées par l'inactivité. Après 6 semaines d'alitement, plusieurs études ont en effet constaté chez

l'homme d'importantes diminutions du diamètre des fibres de type I sans modification du diamètre des fibres de type IIa ou IIx (Berg et al. 1997; Ferretti et al. 1997). Après 5 semaines d'alitement, Borina et al. (2010) ont également observé une diminution de 31% du diamètre des fibres de type I et de seulement 21% des fibres de type IIa. Chez le rongeur, une diminution préférentielle des fibres de type I est généralement rapportée après 14 jours d'immobilisation (Allen et al. 1996; Fitts et al. 2000; Servais et al. 2007), même si des diminutions semblables des fibres de type I et II sont parfois observées (Chopard et al. 2001; Miller et al. 2001). Ces modifications structurales vont logiquement modifier la typologie des différents groupes musculaires inactifs en favorisant une augmentation de la proportion des fibres de type II. En effet, une augmentation de l'expression des isoformes MHC IIx/b ou hybride (I+IIa+IIx/b) couplée à une réduction de celle des MHC I et IIa est généralement observée dans le muscle inactif que ce soit chez l'homme ou le rongeur (Allen et al. 1996; Andersen et al. 1999; Trappe et al. 2004; Borina et al. 2010).

Ces données suggèrent que les modifications typologiques induites par l'inactivité pourraient quelque peu différer de celles observées avec l'avance en âge. Cependant, il a été démontré qu'une pratique régulière de la musculation tout au long de la vie (3 fois/semaine durant une cinquantaine d'années) prévenait efficacement l'atrophie musculaire des fibres de type IIa et IIx observée à partir de 70 ans (Klitgaard et al. 1990; Aagaard et al. 2007). Sundstrup et al. (2010) ont également observé une prévention significative de l'atrophie des fibres de type II chez des footballeurs âgés pratiquant depuis une cinquantaine d'années comparés à des individus sédentaires. Ces quelques données disponibles suggèrent donc que l'inactivité musculaire n'induit donc pas nécessairement les mêmes modifications typologiques lorsqu'elle est radicale et brève ou chronique et modéré.

2. Diminution de la force musculaire

Chez l'homme, une période de 1 à 2 semaines d'inactivité radicale des membres inférieurs induit une réduction de 15% du pic de force des extenseurs du genou à la fois en condition isométrique ou dynamique chez des sujets d'une vingtaine d'années (Berg and Tesch 1996; Deschenes et al. 2008; Suetta et al. 2009). Cette diminution peut atteindre plus de 20% après 4 semaines d'inactivité (Berg et al. 1991). D'autres études se sont intéressées aux effets d'une période de plâtrage de l'avant-bras durant 3 semaines et ont observé également une diminution de 15% du pic de force développée par l'avant bras (Farthing et al. 2009; Homma et al. 2009).

Même si la technique pour évaluer la force maximale est différente de celles utilisées chez l'homme, le modèle de queue suspendue utilisé chez les rongeurs semble plus radical que les modèles d'inactivité radicale utilisés chez l'homme. En effet, Pottle et al. (2000) ont observé une diminution de 30% de la force maximale développée par le muscle soléaire de rats après 7 jours d'inactivité. Suite à 10 jours de suspension par la queue, Wenke et al. (2010) ont observé une diminution semblable dans

le muscle soléaire de souris mais sans modification de la force maximale développée par le muscle gastrocnémien. Lorsque la période de suspension se prolonge à deux semaines, la diminution devient plus importante avec des réductions de la force maximale autour de 50-60% dans le muscle soléaire de rat (Riley et al. 2005; Widrick et al. 2008).

4. Pour résumer...

La définition du concept de sarcopénie constitue un débat d'actualité à la fois dans le monde scientifique et dans le domaine médical. Même si aucun consensus n'est pas encore clairement établi, on peut néanmoins considérer que **la sarcopénie est un syndrome gériatrique se caractérisant dans un premier temps par une diminution de la masse musculaire qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques** (Cruz-Jentoft et al. 2010). La sarcopénie observée chez la personne âgée est évidemment imputable au processus de vieillissement, mais son apparition et son développement peuvent être accélérés sous l'effet de facteurs pathologiques et comportementaux (Buford et al. 2010a). Depuis des milliers d'années et jusqu'à il y a peu de temps, le mode de vie très actif des chasseurs-cueilleurs a prédominé. Aujourd'hui, l'abondance relative de nourriture a progressivement conduit les populations occidentalisées à adopter un mode de vie sédentarisé où l'activité physique est considérablement réduite. Cette inactivité chronique contrarie notre phénotype de mammifère physiquement actif, et favorise l'explosion d'un grand nombre de maladies chroniques contribuant à titre d'exemple à 340000 décès précoces en 2000 aux Etats-Unis pour un coût estimé à 150 milliards de dollars par an (Walker et al. 2003). **De plus en plus de preuves s'accumulent pour montrer que l'inactivité physique contribue également à accélérer l'apparition du vieillissement et avec lui le développement de la sarcopénie** (Buford et al. 2010a). La sarcopénie observée avec l'avance en âge est principalement la conséquence d'une perte et d'une atrophie préférentielles des fibres dites « rapides » (type IIb, IIx, IIa) à l'origine d'une redistribution typologique du muscle vers un profil davantage oxydatif (Lexell et al. 1988; Singh et al. 1999; Hikida et al. 2000). **Ce processus semble impliquer l'inactivité chronique comme en témoignent les études transversales montrant que le degré de sarcopénie et d'atrophie des fibres de type II est moins important chez des individus ou des rongeurs actifs comparés à leurs homologues sédentaires** (Klitgaard et al. 1990; Rosa et al. 2005; Kim et al. 2008; Aagaard et al. 2010).

Chapitre 2 : Comprendre les mécanismes de la sarcopénie pour mieux lutter

1. Mécanismes centraux à l'origine de la sarcopénie

Le développement de moyens d'intervention efficaces pour lutter contre la sarcopénie nécessite la compréhension des mécanismes systémiques et cellulaires impliqués dans ce syndrome gériatrique. Il s'agit d'un véritable défi tant sont nombreux les facteurs impliqués et les différentes interactions pouvant exister entre eux.

Le premier stade de sarcopénie se caractérise par une atrophie musculaire qui en s'aggravant compromet la force musculaire et les performances physiques. Que l'atrophie musculaire soit liée à l'âge ou à d'autres facteurs environnementaux, les mécanismes centraux qui en sont responsables sont toujours les mêmes. Les altérations du turnover protéique (Combaret et al. 2009), des capacités de régénération musculaire (Snijders et al. 2009) ainsi qu'une exacerbation du phénomène d'apoptose (Marzetti et al. 2008a) sont ainsi considérés comme les mécanismes cellulaires responsables de l'atrophie musculaire (Figure 3). Ces derniers sont eux même dépendants d'une multitude de facteurs systémiques et cellulaires comme les facteurs neuromusculaires (Edstrom et al. 2007), l'élévation du stress oxydant (Ji 2001), les dysfonctionnements mitochondriaux (Huang and Hood 2009), l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Lee et al. 2007), l'insulino-résistance (Walrand et al. 2011) ou encore une diminution de la production d'hormones anabolisantes (GH, IGF-1, testostérone) (Lee et al. 2007). (Figure 3). Le processus de vieillissement est responsable de l'activation de ces différents mécanismes, mais d'autres conditions pathologiques ou comportementales, comme l'inactivité physique, vont pouvoir les exacerber ou les stimuler plus précocement accélérant ainsi le développement de la sarcopénie (Figure 3). A ce schéma déjà complexe, il faut ajouter que de nombreuses interactions existent entre les différents mécanismes évoqués et qu'il apparaît encore difficile d'estimer l'importance que peut avoir un mécanisme par rapport à un autre dans le développement de la sarcopénie. A titre d'exemple, la voie protéolytique serait stimulée par un grand nombre de facteurs comme les hormones catabolisantes, les cytokines pro-inflammatoires ou encore le stress oxydant (Rôle des ERDO dans 1, page 56). De plus, le système ubiquitine-protéasome est régulé par diverses voies de signalisation. Ainsi, le TNF- α peut à la fois stimuler la protéolyse via le système ubiquitine protéasome (Altérations du turnover protéique, page 37) mais également induire l'apoptose via la voie extrinsèque apoptotique (Apoptose des noyaux musculaires, page 32). La compréhension de l'ensemble de ces mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire constitue donc un enjeu majeur dans la lutte contre la sarcopénie.

Les travaux menés chez l'animal montrent aussi que le muscle âgé présente une diminution de 20% de sa force spécifique (i.e. la force générée rapportée à la surface du muscle). Ces résultats suggèrent que des modifications qualitatives du muscle participent avec l'atrophie au développement de la sarcopénie (Thompson 2009).

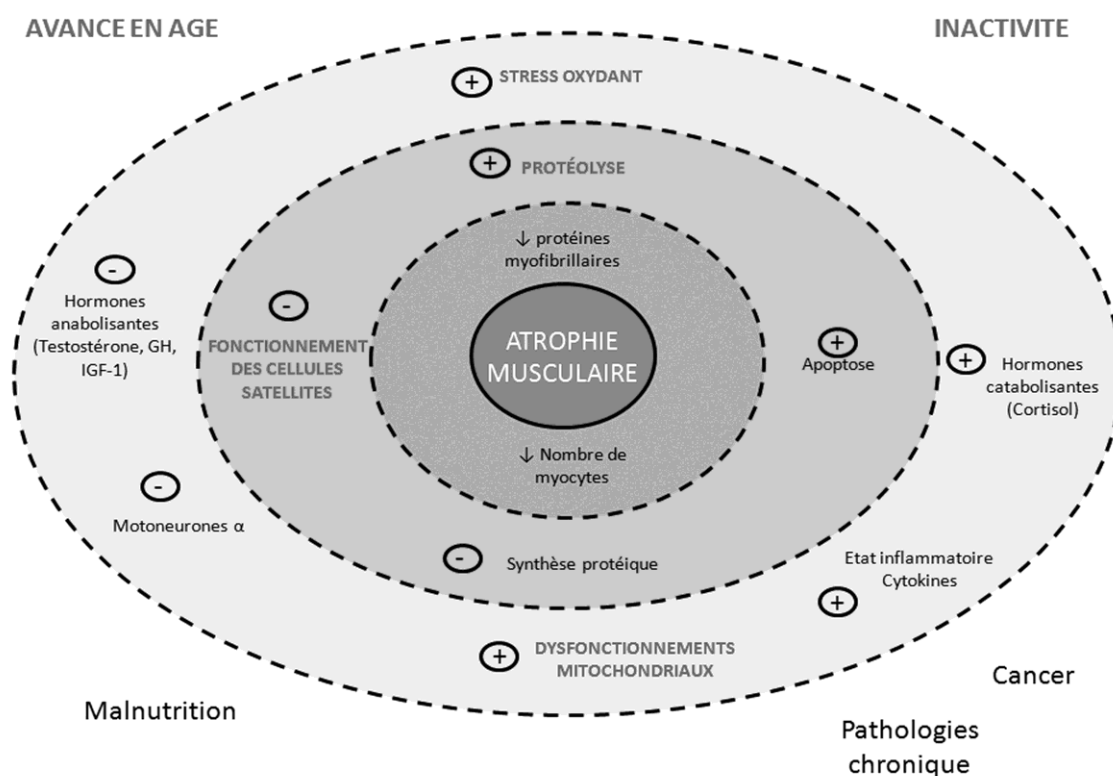


Figure 3. Schéma des mécanismes principaux impliqués dans la sarcopénie (adapté de Buford et al. (2010)). Bien que le vieillissement contribue à lui seul à l'atrophie musculaire, certains comportements tels que l'inactivité ou bien les pathologies chroniques accélèrent ce processus. La figure se lit des anneaux extérieurs vers ceux de l'intérieur conduisant finalement à l'atrophie musculaire. Les signes (+) indiquent une up-régulation et les signes (-) une down-régulation d'une voie mécanistique. Les mécanismes écrits en majuscule sont ceux sur lesquels notre travail se focalisera.

A. Mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire

1. Apoptose des noyaux musculaires

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui s'effectue via une série d'événements morphologiques et biochimiques aboutissant à l'autodestruction de la cellule sans inflammation ou dommages pour les tissus à proximité (Kerr et al. 1972). L'exécution de l'apoptose dans le tissu musculaire présente certaines particularités due à la nature polynucléée des fibres musculaires. Ainsi, l'apoptose dans les fibres musculaires résulterait de l'élimination individuelle de noyaux musculaires et de leur domaine nucléaire n'impliquant pas nécessairement une destruction totale de la fibre musculaire (Dupont-Versteegden 2005). L'apoptose est donc un processus de

régulation indispensable pour le développement et le bon fonctionnement de la fibre musculaire. Il peut néanmoins devenir préjudiciable en cas d'exacerbation. La mitochondrie est considérée comme le principal régulateur des signaux apoptotiques et peut donc induire l'apoptose au travers de différentes voies de signalisation (Wenz et al. 2009).

L'apoptose conduit progressivement à la fragmentation de l'ADN, la condensation nucléaire, la protéolyse, la déformation de la membrane et finalement à la fragmentation de la cellule. Il en résulte des corps apoptotiques qui sont alors pris en charge par les macrophages et les cellules avoisinantes. Ce phénomène d'apoptose peut être déclenché par une voie extrinsèque mettant en jeu le récepteur de mort TNF- α , ou par une voie intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie. Cette dernière agit elle-même selon deux voies de signalisation intracellulaire indépendante ou dépendante des caspases (Figure 4). Les caspases (de l'anglais *cysteine-dependent aspartate-cleaving proteases*) sont un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans le phénomène d'apoptose (Danial and Korsmeyer 2004). Ces caspases existent dans le cytoplasme en tant que précurseurs inactifs (procaspases) qui peuvent être activés par dimérisation ou dégradation partielle. Le déclenchement de l'apoptose repose sur une cascade protéolytique conduisant à l'activation de caspases *initiatrices* (i.e. caspase-8, caspase-9, caspase-12) qui vont elle-même activer des caspases *effectrices* (i.e. caspase-3, caspase-6, caspase-7). Ces dernières induisent alors la fragmentation de l'ADN (via la caspase-activated DNAase) qui aboutira à la mort cellulaire. La voie apoptotique indépendante des caspases fonctionne via la libération mitochondriale de médiateurs (e.g. AIF ou EndoG) capables d'induire directement une fragmentation d'ADN à grande échelle (Figure 4). Mais la mitochondrie peut également déclencher indirectement via les caspases le phénomène d'apoptose (voie dépendantes des caspases). En effet, cet organelle peut libérer dans le cytosol du cytochrome c, qui va aller se fixer sur l'Apoptosis Protease Activating Factor-1 (APAF-1), formant un apoptosome capable d'activer la caspase-9. Cette dernière active alors la caspase-3 finalisant alors le processus apoptotique. Par ailleurs, il est important de souligner le rôle de la famille des protéines Bcl-2 qui régulent la libération mitochondriale des médiateurs apoptotiques précédemment évoqués. Parmi ces protéines, Bcl-2 et Bcl-X_L sont reconnues comme anti-apoptotiques alors que Bax, Bak et Bik favorisent l'apoptose (Figure 4). Le ratio Bax/Bcl-2 est à ce titre considéré comme un index du statut apoptotique (Marzetti et al. 2010).

De plus en plus de données s'accumulent pour montrer qu'une exacerbation du phénomène d'apoptose se produit dans le tissu musculaire âgé ou inactif contribuant probablement au développement de la sarcopénie (Siu et al. 2005; Pistilli et al. 2006; Marzetti et al. 2008b). Il semblerait plus particulièrement que les voies de signalisation intrinsèques impliquant la mitochondrie constituent un mécanisme central dans le développement de l'apoptose dans le muscle

sarcopénique (Marzetti et al. 2010). Les données de la littérature indiquent que les deux modes d'action, avec ou sans la participation des caspases, seraient impliqués dans le développement de la sarcopénie (Marzetti et al. 2008a). Certains travaux suggèrent cependant que la voie indépendante des caspases joue un rôle plus important (Marzetti et al. 2008b). Les élévations chez le rongeur du contenu cytosolique en cytochrome c (Siu et al. 2005), APAF-1 (Dirks and Leeuwenburgh 2004; Siu et al. 2005) et de la forme active de la caspase-9 (Tamilselvan et al. 2007) est en faveur d'une activation de la voie dépendante des caspases dans le tissu musculaire âgé. L'inactivité pourrait éventuellement jouer un rôle comme en témoignent les augmentations de cytochrome c cytosoliques musculaires observées en réponse à une période d'inactivité radicale (Siu et al. 2005). Cependant, d'autres études n'observent aucune modification des contenus cytosoliques du cytochrome c (Dirks and Leeuwenburgh 2004) et APAF-1 (Siu et al. 2005; Baker and Hepple 2006; Pistilli et al. 2006) dans le tissu musculaire âgé ou inactif. Ces résultats controversés concernant la voie dépendante des caspases suggèrent que des voies de signalisation alternatives contribueraient également à l'exacerbation de l'apoptose dans le muscle sarcopénique. En effet, il a été démontré que l'avance en âge était associée à une élévation du contenu nucléaire des facteurs EndoG et AIF au sein du tissu musculaire (Dirks and Leeuwenburgh 2004; Baker and Hepple 2006; Marzetti et al. 2008b). De plus, certains travaux rapportent des corrélations négatives entre l'expression nucléaire de ces deux facteurs et la masse musculaire (Marzetti et al. 2008b), suggérant donc une implication de la voie indépendante des caspases dans la sarcopénie.

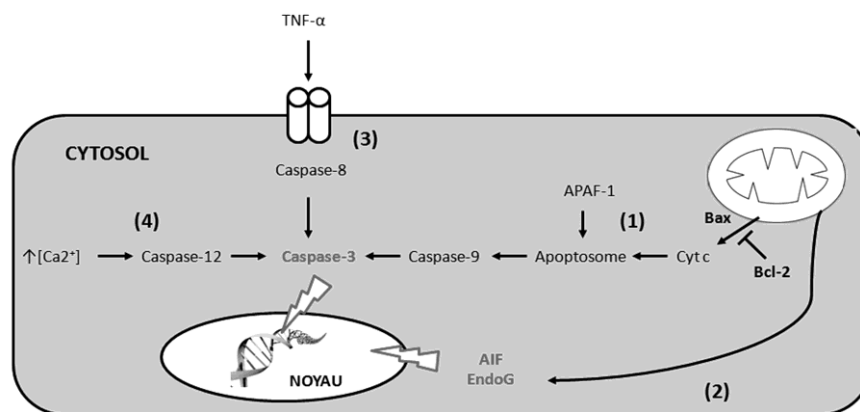


Figure 4. Voies de signalisation simplifiée de l'apoptose dans le tissu musculaire. La mitochondrie déclenche l'apoptose via la libération du cytochrome c dans le cytosol aboutissant à la formation d'un apoptosome et à l'activation respective des caspases-9 et -3 (1). Plusieurs médiateurs (e.g. Bax et Bcl-2) peuvent moduler la perméabilité de la membrane externe mitochondriale, régulant ainsi la libération de cytochrome c. La mitochondrie peut également libérer les médiateurs AIF et/ou EndoG qui induisent directement l'apoptose (2). La voie extrinsèque de l'apoptose stimule le récepteur TNF- α induisant l'activation de la caspase-3 par la caspase-8 (3). Enfin le réticulum endoplasmique peut également induire l'apoptose via le calcium qui activera la caspase-3 via la caspase-12 (4).

2. Altérations de la régénération musculaire

Les fibres musculaires contiennent des centaines de noyaux, et on considère que chaque noyau musculaire contrôle l'expression des gènes pour une certaine quantité de cytoplasme. Ce concept fait référence à ce qu'on appelle le domaine nucléaire (Cheek 1985). Il a ainsi été montré que l'évolution de la taille d'une fibre musculaire (dans le cas de l'atrophie ou l'hypertrophie) s'accompagnait d'une modification du nombre de noyaux musculaires et/ou de leur domaine nucléaire (Allen et al. 1999). Cependant, les fibres musculaires sont des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire qu'elles ne sont plus à même de se diviser pour se développer. C'est pour cette raison que le processus de régénération musculaire est dépendant d'un pool de précurseurs cellulaires myogéniques indifférenciés que l'on appelle plus communément cellules satellites (SC) (Mauro 1961). Durant le développement postnatal, les SC prolifèrent et se différencient pour fournir de nouveaux noyaux musculaires indispensables pour la croissance de la fibre musculaire (Encadré 2, Figure 1). Dans des fibres musculaires matures, les SC sont généralement en état de quiescence mais peuvent devenir actives en réponse à un traumatisme. Elles vont alors proliférer puis fusionner avec des fibres musculaires existantes. Néanmoins, elles peuvent également fusionner entre elles suite à des dommages musculaires pour former de nouvelles fibres musculaires et remplacer les fibres endommagées (Mauro 1961; Hawke and Garry 2001). Dans le cadre d'une activité musculaire normale, de légers dommages se produisent continuellement au niveau des fibres musculaires, mais ceux-ci deviennent plus fréquents et importants avec l'avance en âge (Appell 1986; Warren et al. 1994; Brooks and Faulkner 1996). Par conséquent, une réserve de cellules satellites fonctionnelles est indispensable pour alimenter continuellement la régénération musculaire et assurer ainsi le maintien du volume et du nombre de fibres musculaires.

La grande majorité des travaux menés chez le rongeur démontrent que l'inactivité radicale et l'âge réduisent le nombre de SC quiescentes et activées au sein du tissu musculaire (Mozdziak et al. 1998; Dedkov et al. 2003; Brack et al. 2005; Wang et al. 2006; Kawano et al. 2008; Zhang et al. 2010). Chez l'homme, il semblerait que le pool de SC soit maintenu jusqu'à environ 70 ans (Roth et al. 2000; Dreyer et al. 2006; Petrella et al. 2008) puis décline par la suite (Renault et al. 2002; Kadi et al. 2004; Sajko et al. 2004; Verdijk et al. 2007) (Tableau 6). Cette réduction semble d'ailleurs s'opérer préférentiellement dans les fibres musculaires de type II (Verdijk et al. 2007) ce qui coïncide tout à fait avec le développement préférentiel de la sarcopénie dans les muscles à typologie rapide.

Tableau 6. Effets du vieillissement sur le contenu en cellules satellites chez l'homme

Etudes	Sexe	Age (années)	Muscle étudié	Evolution du pool de SC
Dreyer et al. (2006)	M	21-35 vs > 60	Vaste latéral	=
Kadi et al. (2004)	M	20-32 vs 70-83	Tibial antérieur	↓ (37%)
	F	20-32 vs 70-83	Tibial antérieur	↓ (25%)
Renault et al. (2002)	M/F	23 ± 1 vs 74 ± 4	Biceps brachial	↓ (62%)
Roth et al. (2004)	M	25 ± 3 vs 69 ± 4	Vaste latéral	=
	F	26 ± 1 vs 67 ± 3	Vaste latéral	=
Sajko et al. (2004)	M/F	29 ± 2 vs 71 ± 1	Vaste latéral	↓ (36%)
Petrella et al. (2006)	M	20-35 vs 60-75	Vaste latéral	=
	F	20-35 vs 60-75	Vaste latéral	=
Verdijk et al. (2007)	M	20 ± 1 vs 76 ± 1	Vaste latéral	↓ (44%)

Il est également important de souligner que l'avance en âge est aussi associée à une altération des capacités des SC à proliférer (Conboy et al. 2003; Matsuba et al. 2009). La sénescence répliquative est un mécanisme souvent évoqué pour expliquer ce phénomène (Jejurikar and Kuzon 2003). Néanmoins, ce mécanisme ne semble pas pertinent pour la sarcopénie dans la mesure où le potentiel *in vitro* de prolifération des SC demeure globalement inchangé avec l'âge (Renault et al. 2000). Cependant, les SC isolées du muscle d'hommes ou de rongeurs âgés présentent des altérations de leur capacité de différenciation aboutissant à la formation de myotubes moins bien structurés et plus fragiles (Renault et al. 2000; Lees et al. 2006).

Des facteurs extrinsèques aux SC comme l'environnement cellulaire ou systémique sont certainement en partie responsables de la détérioration des capacités de régénération du muscle âgé. Il a été en effet démontré que les SC âgées sont capables de produire une réponse régénérative efficace lorsqu'elles sont exposées à un environnement cellulaire ou systémique jeune (Carlson and Faulkner 1989; Conboy et al. 2005; Carlson and Conboy 2007). Reconnu comme activatrice des SC, la voie de signalisation Notch pourrait jouer un rôle clé dans ce phénomène (Carlson and Conboy 2007). En s'appuyant sur la parabiose hétérochronique (Figure 5), il a ainsi été démontré que cette voie de signalisation était altérée dans le tissu musculaire vieillissant, mais restaurée dans un environnement systémique jeune (Conboy et al. 2003; Carlson et al. 2009).

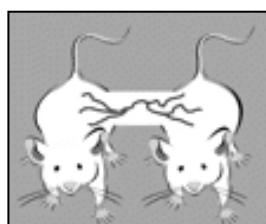


Figure 5. Modèle de parabiose hétérochronique où un rongeur jeune et un rongeur âgé partagent le même système circulatoire.

Le stress oxydant pourrait également être responsable de la réduction de l'activité des SC dans le tissu musculaire âgé ou inactif (Rôle des ERDO dans la régénération musculaire, page 56). Par ailleurs, la myostatine est un facteur de croissance reconnu comme inhibiteur de la régénération

musculaire. Certains travaux ont montré qu'elle limitait la différenciation des myoblastes mais inhibait également leur prolifération, en modulant notamment l'activité de certains inhibiteurs des cyclines kinases dépendantes (CKI) (p21 et p27) (Thomas et al. 2000; Langley et al. 2002) (Encadré 2, Figure 1). L'implication de la myostatine comme inhibiteur de la régénération musculaire a donc engendré un certain nombre de travaux visant à découvrir si l'inhibition de cette protéine pouvait constituer un moyen thérapeutique pour lutter contre la sarcopénie. Ainsi, il a été démontré que le vieillissement s'accompagnait de moindres réductions du diamètre des fibres musculaires et du contenu en SC quiescentes et activées chez des souris KO en myostatine comparées à leurs homologues wild-type (Siriett et al. 2006). Plus récemment, Siriett et al. (2007) ont montré que l'administration d'un antagoniste de la myostatine chez des souris permettait également d'augmenter l'activation et la prolifération des SC durant un processus de régénération musculaire au sein du tissu musculaire âgé.

3. Altérations du turnover protéique

Les altérations du turnover protéique, c'est-à-dire de la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines, constituent également un facteur favorisant la sarcopénie (Combaret et al. 2009). La synthèse protéique postprandiale semble tout particulièrement affectée dans le muscle âgé et inactif (Guillet et al. 2004; Cuthbertson et al. 2005; Fujita et al. 2009; Phillips et al. 2009) et constitue l'un des mécanismes responsables de la réduction du contenu en protéines musculaires. Il est désormais bien connu que la synthèse protéique est stimulée par plusieurs facteurs tels que la disponibilité en acides aminés (particulièrement en leucine), l'activité physique ou encore une augmentation de l'insuline circulante. Plusieurs travaux ont montré spécifiquement dans le muscle âgé que les altérations de la synthèse protéique postprandiale s'expliquaient par la progressive insulino-résistance s'opérant avec l'avance en âge (Guillet et al. 2004) mais également par une plus faible réceptivité du muscle âgé aux effets stimulant des acides aminés ou de l'activité physique (Wolfe 2006; Drummond et al. 2008). Ce dernier mécanisme pourrait d'ailleurs s'expliquer par une plus faible réactivité de la voie de signalisation Akt/mTOR dans le tissu musculaire âgé (Cuthbertson et al. 2005). Par ailleurs, l'état chronique inflammatoire modéré observé chez les personnes âgées pourrait également affecter indirectement la synthèse protéique (Balage et al. 2010). Cette hypothèse semble d'autant plus valable qu'une augmentation claire de la synthèse protéique postprandiale est observée chez des rongeurs âgés traités avec de l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Rieu et al. 2009).

Encadré 2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie

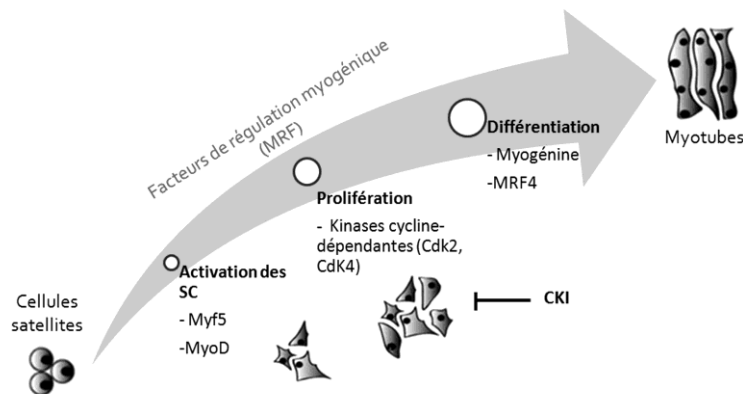


Figure 1. Activation, prolifération et différenciation des cellules satellites. L'activation des cellules satellites quiescentes va stimuler l'expression de facteurs de régulation myogénique (MRF), Myf5 et MyoD, conduisant à la transformation des cellules satellites en myoblastes. Ces myoblastes vont alors proliférer sous le contrôle des protéines kinases cyclines-dépendantes (Cdk2, Cdk4...). La prolifération est ensuite bloquée par les protéines inhibitrices des protéines kinases cyclines-dépendantes (CKI) permettant alors la différenciation des myoblastes en myotubes sous l'action d'autres MRFs, la myogénine et MRF4.

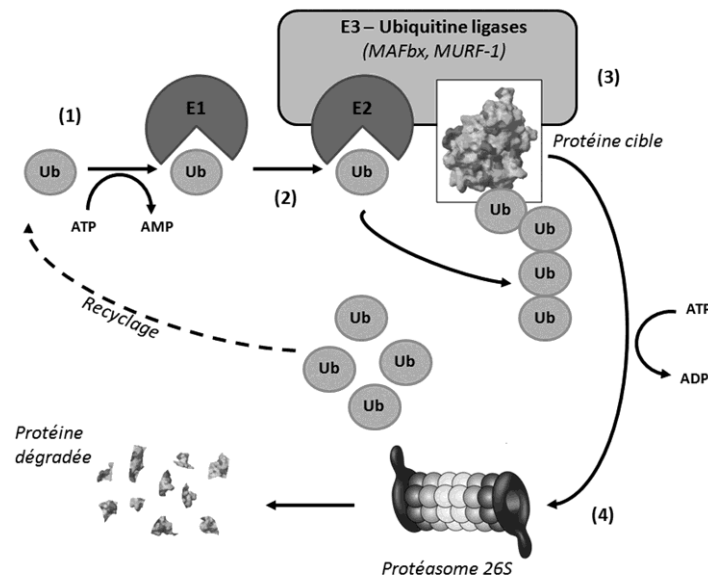


Figure 2. Système ubiquitine-protéasome. L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 8 kDa qui est dans un premier temps transférée à l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) via une réaction dépendante de l'ATP (1). L'ubiquitine active est alors transférée à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) (2). L'ubiquitine est finalement fixée à la protéine cible par une ubiquitine ligase E3 (e.g MAFbx et MURF1) aboutissant à la formation d'une chaîne polyubiquitinée (3). La protéine polyubiquitinée peut être alors reconnue puis dégradée par le protéasome 26S (4).

D'un autre côté, les cytokines pro-inflammatoires (notamment TNF- α et IL-6) dont les concentrations musculaires augmentent avec l'âge et l'inactivité (Schaap et al. 2009), sont reconnues comme stimulant la protéolyse musculaire via l'activation du système ubiquitine-protéasome (Llovera et al. 1997). Cette voie métabolique est responsable de l'accélération de la protéolyse musculaire et est initiée par la fixation répétée d'ubiquitine sur les protéines ciblées pour la dégradation. Les protéines ubiquitinées sont alors transférées vers un complexe protéolytique, le protéasome, où l'hydrolyse de la protéine se produira (Encadré 2, Figure 2). Les données existantes concernant le fonctionnement de ce système ubiquitine-protéasome dans le muscle âgé et inactif suggèrent assez clairement son implication dans la sarcopénie. En effet, il a été démontré que les capacités d'ubiquitination ainsi que le contenu en protéines ubiquitinées étaient augmentés dans le muscle âgé (Altun et al. 2010) comme inactif (Yimlamai et al. 2005; Vazeille et al. 2008). Cette ubiquitination des protéines est assurée par un système complexe d'enzymes dans lequel les E3-ubiquitine ligases MAFbx et MuRF-1 jouent un rôle essentiel. De manière intéressante, plusieurs travaux ont ainsi observé que l'expression et le contenu protéique de MAFbx et MuRF-1 augmentaient dans le muscle âgé (Clavel et al. 2006; Hepple et al. 2008) et inactif (Krawiec et al. 2005; Ogawa et al. 2006). Enfin, des travaux récents ont montré que le contenu en protéasome 26S, c'est-à-dire la forme reconnaissant et dégradant les protéines ubiquitinées, était augmenté dans le muscle avec l'âge (Altun et al. 2010).

Parallèlement aux cytokines pro-inflammatoires, les glucocorticoïdes sont impliqués dans le catabolisme des protéines musculaires. A titre d'exemple, plusieurs études ont montré que les concentrations plasmatiques en cortisol étaient positivement corrélées avec le degré d'atrophie et de perte de force musculaire chez les personnes âgées (Izquierdo et al. 2001; Peeters et al. 2007). Cette hormone est en effet reconnue comme limitant la signalisation IGF-1/insuline, bloquant la production d'IGF-1 et stimulant la protéolyse via les systèmes ubiquitine-protéasome et lysosomaux (Schakman et al. 2008). Même si l'implication des glucocorticoïdes dans la régulation de la protéolyse est encore mal établie, des travaux ont montré que les glucocorticoïdes étaient capables de stimuler l'expression de MAFbx et MuRF1 en augmentant le facteur de transcription FoxO (Sandri et al. 2004; Sandri et al. 2006)(Figure 7, page 72).

Bien que le système ubiquitine-protéasome soit le principal responsable de la dégradation de la majorité des protéines dénaturées, l'autophagie représente un autre système de contrôle de la qualité des protéines qui pourrait significativement contribuer au développement de la sarcopénie. L'autophagie est un processus permettant à la cellule de digérer une partie de ses organites endommagés grâce aux lysosomes (Levine and Klionsky 2004). Elle est ainsi responsable dans le muscle de la dégradation des protéines membranaires, endocytosées et également des protéines extracellulaires (Lecker et al. 1999). Il est important de souligner que l'autophagie est le seul

mécanisme connu capable de dégrader des organites cellulaires comme par exemple des mitochondries endommagées (Lemasters 2005). Par ailleurs, les agrégats protéiques sont pris en charge par la voie autophagique quand le système ubiquitine-protéasome fonctionne mal ou est dépassé. Le fonctionnement autophagique décline dans la plupart des tissus (Cuervo and Dice 2000; Cuervo et al. 2005), ce qui induit une accumulation de lipofuscine, d'agrégats protéiques et de mitochondries endommagées (Terman and Brunk 2006). Les travaux sur le sujet ne sont qu'à leur balbutiement et nécessitent d'être approfondis pour comprendre comment la fonction autophagique intervient dans le développement de la sarcopénie.

4. Dysfonctions mitochondriales

La mitochondrie est un organite se situant dans n'importe quelle cellule eucaryote, et notamment dans la fibre musculaire. Son rôle physiologique est primordial puisqu'elle contribue à la fois à la régulation de l'homéostasie calcique, de l'apoptose et du cycle cellulaire, mais représente surtout le principal pourvoyeur d'ATP dans la cellule (Huang and Hood 2009). Au regard de toutes ces responsabilités vitales, il apparaît logique que des altérations du fonctionnement et de l'intégrité mitochondriale soient impliquées dans le développement de la sarcopénie (Adhihetty et al. 2008). Dérivée de la célèbre théorie du vieillissement des radicaux libres avancée par Harman dans les années 50 (Harman 1956a), la théorie mitochondriale du vieillissement considère que les dysfonctions mitochondriales provenant des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont essentiels dans le processus de vieillissement (Harman 1972; Miquel et al. 1980).

La mitochondrie constitue l'une des principales sources cellulaires d'espèces dérivées de l'oxygène (ERDO). C'est pourquoi ces composants sont directement et particulièrement touchés par les dommages oxydatifs (Production d'ERDO, page 44). L'ADNmt constitue une cible importante des ERDO en raison de sa proximité avec la chaîne de transport des électrons (ETC) (Yakes and Van Houten 1997), mais également de l'absence d'histones mitochondriales (Wei and Lee 2002). En raison de la concentration du génome mitochondrial (i.e. absence d'introns), chaque mutation au niveau de l'ADNmt est de plus susceptible d'affecter l'intégrité d'un gène, et par conséquent les fonctions de la protéine qu'il encode (Wei and Lee 2002). Ces mutations au niveau de l'ADNmt peuvent ainsi conduire à la synthèse de protéines dysfonctionnelles qui seront responsables d'altérations de la phosphorylation oxydative, de la diminution de la production d'ATP et de l'augmentation de la production mitochondriale d'ERDO (Harman 1956a; Miquel et al. 1980).

De nombreux travaux appuient donc l'hypothèse que les dommages et mutations de l'ADNmt contribuent au vieillissement musculaire et aux pathologies associées à l'avance en âge. En effet, l'accumulation de mutations suppressives du génome mitochondrial ont été observées avec l'avance en âge chez l'homme comme chez le rongeur (Wanagat et al. 2001; Bua et al. 2006). De plus, il a été

montré que des souris transgéniques surexprimant une protéine responsable de mutations au niveau de l'ADNmt présentaient un état de vieillissement prématuré illustré par une sarcopénie précoce et une espérance de vie plus faible que leurs homologues wild-type (Kujoth et al. 2005). L'implication des mutations de l'ADNmt dans la sarcopénie s'expliquerait entre autres par les dysfonctions mitochondriales qu'elle induit comme en témoignent les réductions des activités des complexes COXI et COXIV de la chaîne de transport des électrons observées dans le tissu musculaire âgé (Lee et al. 1998; Cao et al. 2001; Wanagat et al. 2001). Cependant, le degré d'implication des mutations de l'ADNmt dans les dysfonctions mitochondriales au sein du muscle âgé reste controversé. En effet, il a été démontré que ces dysfonctions apparaissent avec l'âge avant que l'ADNmt soit nécessairement touché (Conley et al. 2007). Cela impliquerait donc d'autres facteurs responsables des dysfonctions mitochondriales comme notamment une dérégulation de la biogenèse mitochondriale ou du contrôle de qualité des protéines mitochondriales.

La morphologie et le fonctionnement mitochondrial dépendent directement de l'équilibre entre la synthèse et l'assemblage protéique, et l'élimination des protéines endommagées ou mal assemblées. Le déclin du contenu et du fonctionnement mitochondrial avec l'âge pourrait donc s'expliquer également par une altération de la synthèse des protéines mitochondriales (GENUM) (Encadré 9, page 71). L'émergence de l'analyse protéomique a en effet permis de voir que l'avance en âge est associée à une réduction globale des gènes codant pour les protéines de l'ETC dans le tissu musculaire (Zahn et al. 2006). Cette diminution de la biogenèse mitochondriale pourrait s'expliquer en partie par la réduction de l'activité du co-activateur peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α), l'un de ses principaux régulateurs (Anderson and Prolla 2009) (Implication de PGC-1 α dans la sarcopénie, page 65). D'un autre côté, une altération des voies de dégradation pour éliminer les différents compartiments endommagés de la mitochondrie pourrait également contribuer aux dysfonctionnements mitochondriaux musculaires (Huang and Hood 2009). A titre d'exemple, la Lon Protéase, exprimée spécifiquement dans la mitochondrie, est responsable de la dégradation des protéines anormales de la matrice mitochondriale, et voit son activité réduite dans le tissu musculaire âgé (Bota and Davies 2002; Bota et al. 2002). Par ailleurs, les mitochondries dysfonctionnelles sont normalement éliminées par « mitophagie » (autophagie de la mitochondrie). Ce processus semble moins efficace avec l'avance en âge, et tout particulièrement dans le tissu musculaire en raison notamment d'altérations du fonctionnement des lysosomes (Brunk and Terman 2002). La réduction de la clairance des mitochondries endommagées couplée à une diminution de leur biogenèse pourraient donc contribuer aux altérations du fonctionnement mitochondrial, et donc favoriser la sarcopénie (Dirks et al. 2006).

La réduction de la production d'énergie résultant de l'ensemble de ces dysfonctionnements mitochondriaux conduirait à une accélération de la nécrose ou de l'apoptose des fibres musculaires. En effet, les processus apoptotiques sont accélérés lorsque le déficit énergétique augmente au sein d'une cellule (Shiraishi et al. 2001; Izyumov et al. 2004; Lyamzaev et al. 2004). Lorsque ce déficit atteint un seuil critique, la nécrose se substitue à l'apoptose (Gabai et al. 2000; Yaglom et al. 2003). Cependant, ces différents seuils de déficit énergétique qui déterminent le mode de mort cellulaire ne sont pas encore clairement établis, tout comme le lien direct existant dans le muscle âgé entre le déficit énergétique et les processus de mort cellulaire.

B. Mécanismes impliqués dans les altérations des qualités contractiles du muscle

L'atrophie musculaire joue un rôle majeur dans la diminution de force musculaire associée à la sarcopénie. Néanmoins, de nombreux travaux menés chez l'animal ont montré qu'une partie de la diminution avec l'âge de la force musculaire était indépendante de la réduction du diamètre de la surface transversale du muscle. Ces travaux ont ainsi démontré que la force spécifique de fibres musculaires isolées (i.e. la force générée rapportée à la surface de la fibre) diminuait également avec l'âge (Renganathan et al. 1998; Thompson and Brown 1999; Gonzalez et al. 2000). Plusieurs mécanismes sont avancés pour expliquer ce phénomène comme des modifications post-traductionnelles des protéines contractiles (Lowe et al. 2001) et/ou un découplage du complexe excitation-contraction (Wang et al. 2000).

L'évaluation des qualités contractiles d'une fibre musculaire peut se faire selon deux approches expérimentales : l'une conservant les fibres musculaires intactes, l'autre utilisant des fibres musculaires perméabilisées. La première approche permet aux fibres musculaires de conserver un sarcolemme normal avec un système de couplage excitation-contraction fonctionnel alors que les fibres musculaires perméabilisées présentent un système de couplage excitation-contraction déficient. Grâce à l'approche basée sur des fibres musculaires intactes, il a pu être mis en évidence l'implication du couplage excitation-contraction dans les altérations avec l'âge des qualités contractiles musculaires. Ainsi, la libération maximale de calcium par le réticulum sarcoplasmique serait réduite dans le tissu musculaire âgé de rongeurs (Jimenez-Moreno et al. 2008). Ce phénomène s'expliquerait par les diminutions de l'expression de la dihydropyridine et des récepteurs à la ryanodine, responsables de la conversion de la dépolarisation membranaire en libération de calcium cytosolique (Payne et al. 2004). Les travaux focalisés sur les fibres musculaires perméabilisées ont permis quant à eux de démontrer que la diminution de la force spécifique s'expliquerait également par des modifications structurales de la myosine conduisant à une réduction de la fraction de têtes de myosine à se fixer sur les filaments d'actine (Lowe et al. 2001; Thompson et al. 2001; Lowe et al. 2004).

C. Pour résumer...

La diminution de la force musculaire constatée dans la sarcopénie est essentiellement due à l'atrophie musculaire, même si une diminution de la force spécifique (i.e. la force générée rapportée à la surface de la fibre) est également impliquée. L'atrophie musculaire s'explique en partie par **la réduction de la synthèse protéique musculaire** et **l'augmentation de la dégradation protéique** via l'activation du système ubiquitine-protéasome. **L'apoptose des noyaux musculaires** en réduisant le domaine nucléaire des fibres musculaires apparaît également un mécanisme essentiel dans l'atrophie du muscle âgé. Ce phénomène est probablement aggravé par **les altérations des capacités de régénération musculaire** limitant l'incorporation de nouveaux noyaux au sein des fibres musculaires vieillissantes. La réduction du pool de cellules satellites et de leurs capacités de prolifération et de différenciation (en raison notamment d'un environnement cellulaire et systémique moins fonctionnel) apparaissent être responsables des altérations de la régénération musculaire.

Même si les mécanismes responsables de l'atrophie musculaire ne sont pas exactement identiques, de grandes similitudes existent entre les effets de l'âge et de l'inactivité suggérant que cette dernière pourrait favoriser le développement de la sarcopénie des populations âgées. Ces mécanismes font intervenir des facteurs cellulaires et systémiques comme **les dysfonctions mitochondriales**, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la production d'hormones anabolisantes (GH, IGF-1, testostérone, insuline). Les liens et interactions entre ces multiples facteurs restent encore mal connus. Un candidat potentiel pourrait être le stress oxydant chronique. Les travaux récents soulignent l'implication de celui-ci dans la sarcopénie.

2. Implications du stress oxydant dans la sarcopénie

A. Généralités sur le stress oxydant

Au sein de l'organisme, des molécules d'oxygène ou d'azote, instables électroniquement, sont rapidement converties en espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERDO) ou de l'azote (ERDA). Ces espèces peuvent être de nature radicalaire ou non radicalaire et les plus importantes sont l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyle (OH°), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\circ}$) (Encadré 3). Les membranes lipidiques, les protéines structurales et régulatrices ainsi que les acides nucléiques constituent des molécules privilégiées subissant les attaques des espèces radicalaires. Ces attaques peuvent induire des dommages dans les structures et le fonctionnement cellulaire. Dans des conditions normales, les espèces radicalaires sont en permanence produites en faible quantité au sein de l'organisme. Cette production basale est néanmoins contrôlée efficacement par les défenses antioxydantes enzymatiques ou non-enzymatiques limitant donc les dommages oxydatifs. On parle dans ce cas d'un équilibre de la balance « oxydants-antioxydants ». Cependant, si les défenses antioxydantes ne sont plus à même de prendre en charge la production d'ERDO et ERDA, une surproduction d'espèces réactives au sein de la cellule s'opère engendrant des dommages considérables et perturbant les voies de signalisation intracellulaire. Un déséquilibre de la balance « oxydants-antioxydants » et de l'homéostasie redox se produit alors, appelé communément stress oxydant (Jones 2006).

B. Stress oxydant dans le muscle âgé et inactif

La sarcopénie est associée à un stress oxydant dans le tissu musculaire. Le stress oxydant pourrait contribuer à induire l'atrophie musculaire en activant ou en inhibant un certain nombre de voies de signalisation moléculaire impliquées dans la régulation de la masse musculaire. Par ailleurs, ce stress oxydant pourrait également altérer les qualités contractiles du muscle, et ce indépendamment de l'atrophie musculaire (Reid 2008).

1. Production d'ERDO

Les travaux de la littérature révèlent un certain nombre de points communs concernant les sites de production d'ERDO dans le muscle âgé ou en état d'inactivité radicale. L'âge tout comme l'inactivité radicale sont associés à une augmentation de la production $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 au sein du tissu musculaire (Bejma and Ji 1999; Capel et al. 2005; Vasilaki et al. 2006a; Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). Dans le cadre de cette partie, nous nous centrerons sur les effets de l'âge et l'inactivité sur les principaux sites de production d'ERDO dans le tissu musculaire.

Encadré 3. Les espèces réactives

Classification des espèces réactives

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène

Primaires

- Anion superoxyde $O_2^{\circ-}$
- Radical hydroxyle OH°
- Radical peroxyde RO_2°
- Radical alcoyle RO°
- Radical hydroperoxyde HO_2°

Secondaires

- Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
- Hydroperoxyde $ROOH$
- Acide hypochloreux $HOCl$
- Ozone O_3
- Oxygène singulet 1O_2

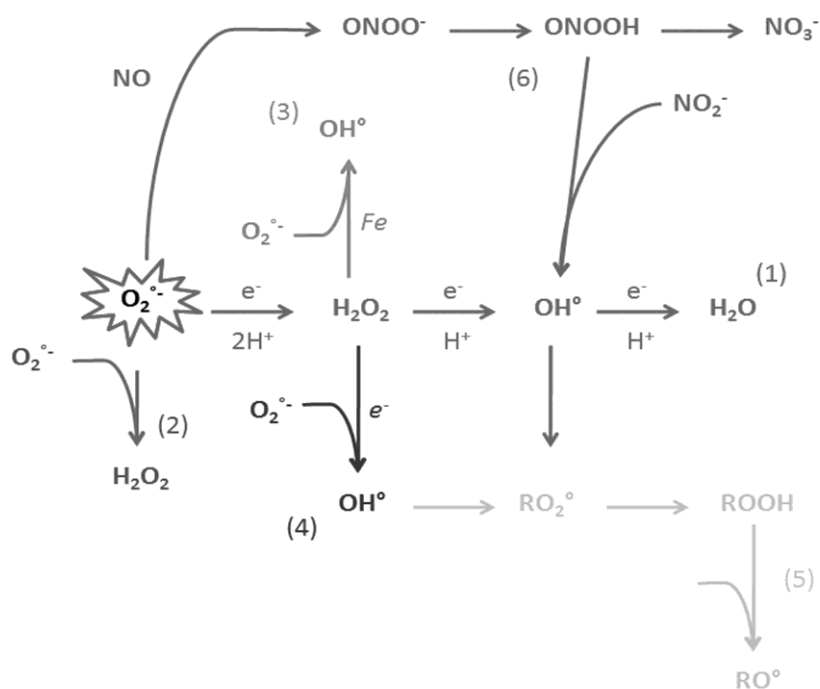
Les espèces réactives dérivées de l'azote

Primaires

- Monoxyde d'azote $^{\circ}NO$
- Dioxyde nitrique NO_2°

Secondaires

- Peroxynitrite $ONOO^-$
- Acide nitreux HNO_2
- Acide peroxynitreux $ONOOH$
- Alcoyle peroxynitrique $ROONO$



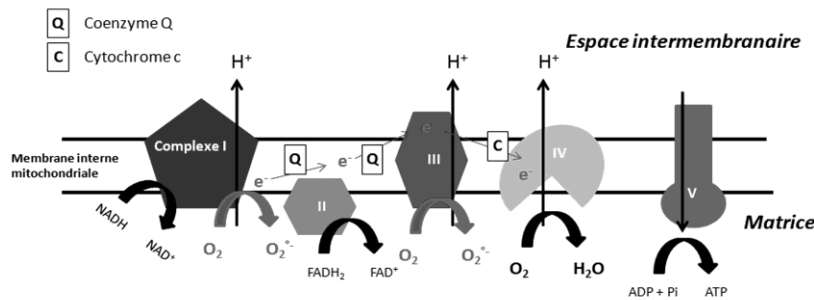
Réactions en cascade de la formation des espèces réactives de l'oxygène à partir de la formation de l'anion superoxyde

La production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), par l'ajout d'un électron sur la dernière couche électronique de l'oxygène, peut provenir d'un certain nombre de sources intracellulaires (Encadré 3). La mitochondrie est généralement citée comme la principale source de production d' $O_2^{\cdot-}$ dans le tissu musculaire dans la mesure où 2 à 5% de la totalité de l'oxygène consommé par la mitochondrie subit une réduction monoélectronique pour former de l' $O_2^{\cdot-}$ (Boveris and Chance 1973). La surproduction mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ observée avec l'avance en âge s'expliquerait essentiellement par des dysfonctions de l'ETC (Ji 2001). Il semblerait en effet que les complexes I (NADH-ubiquinone réductase) et III (Ubiquinone-cytochrome c réductase) de l'ETC soient à l'origine d'une surproduction d'ERDO mitochondriale avec l'avance en âge (Capel et al. 2004; 2005) (Encadré 4, Figure 1). Cette dernière se produirait principalement dans les muscles de type I comme le soléaire (Drew et al. 2003; Capel et al. 2004). Néanmoins, il semblerait que la production mitochondriale basale d' $O_2^{\cdot-}$ soit très nettement supérieure dans les muscles à prédominance glycolytique, et ce indépendamment de l'âge (Capel et al. 2004; Anderson and Neufer 2006). Ces résultats suggèrent donc que l'avance en âge est associée à une augmentation progressive de la production mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ dans les muscles oxydatifs, alors que les muscles glycolytiques seraient eux exposés dès l'âge adulte à une production mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ importante. Cela pourrait en partie expliquer l'atteinte préférentielle des fibres de type II dans le muscle âgé. Il est intéressant de noter que des travaux récents ont aussi montré que l'inactivité radicale induisait une élévation de la production mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ au sein du tissu musculaire (Kavazis et al. 2009; Xu et al. 2010) suggérant une possible implication de l'inactivité dans l'augmentation des concentrations mitochondriales d' $O_2^{\cdot-}$ observée dans le muscle âgé.

La xanthine oxydase (XO) et la xanthine déshydrogénase (XDH) sont deux isoenzymes de la xanthine oxydoréductase impliquées dans le catabolisme des purines. Elles catalysent en effet l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique. Alors que la XDH transfère préférentiellement au NAD^+ les électrons générés durant le processus d'oxydation, la XO utilise l'oxygène pour ce processus produisant par conséquent de l' $O_2^{\cdot-}$ (Hellsten et al. 1988) (Encadré 4, Figure 2). Il a été démontré que l'avance en âge était associée à une augmentation de l'activité enzymatique de la XO que ce soit dans des muscles préférentiellement oxydatifs (Lambertucci et al. 2007) ou glycolytiques (Aranda et al. 2007; Hofer et al. 2008). De la même manière, Kondo et al. (1993a) ont observé que l'inactivité radicale induisait une élévation de l'activité de la XO dans le tissu musculaire. L'inactivité chronique pourrait donc aussi participer à augmenter l'activité de la XO au sein du tissu musculaire âgé.

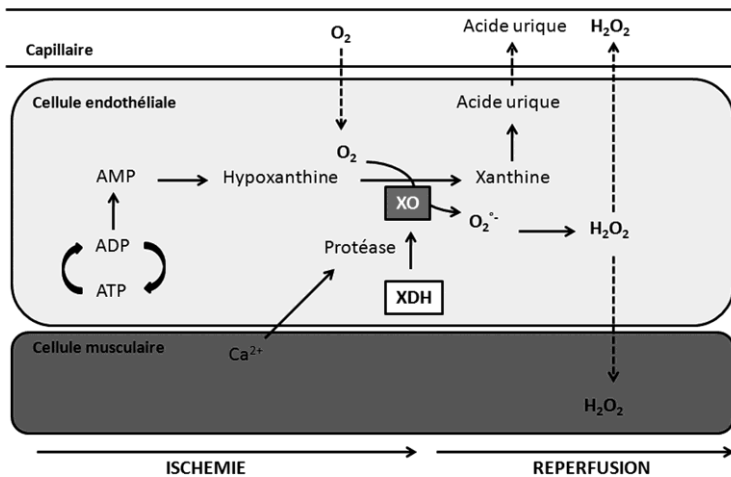
Encadré 4. Sources d'ERDO dans le tissu musculaire

Figure 1. Les ERDO produits par la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie



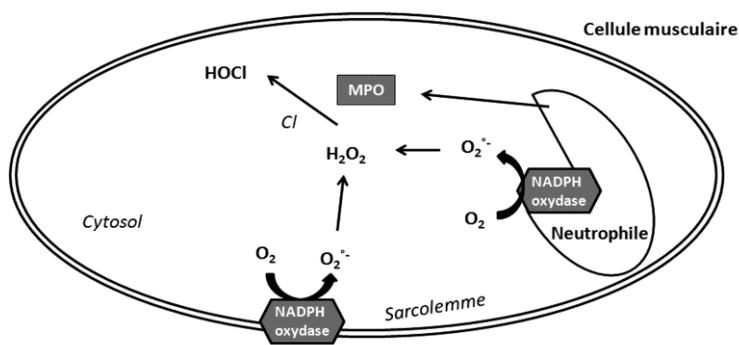
95 à 98% de l'oxygène est réduit en eau au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire. Néanmoins, le transfert des électrons au sein de la chaîne de transport est imparfait. Une fuite d'électrons célibataires, au niveau des complexes I et III aboutit dans 2 à 5% des cas à la formation d' $O_2^{\bullet-}$ à partir de l' O_2 déclenchant une cascade de production d'ERDO.

Figure 2. Les ERDO produits par la xanthine oxydase



L'ischémie favorise la production d'hypoxanthine et donc l'activation de la xanthine oxydase. Au cours de la reperfusion, l'oxygène catalyse la réaction de la xanthine oxydase avec l'hypoxanthine favorisant la production d' $O_2^{\bullet-}$. L'anion superoxyde est rapidement converti en H_2O_2 qui va ensuite diffuser dans le sang et le tissu musculaire.

Figure 3. Les ERDO produits lors de la réponse inflammatoire par la NADPH oxydase et la myéloperoxydase (MPO)



La NADPH oxydase peut être activée en cas d'inflammation au sein d'un neutrophile infiltré dans le tissu musculaire. Une forme constitutive musculaire de la NADPH située au niveau du sarcolemme semble également pouvoir être activée lors de l'activité contractile de la fibre. La NADPH oxydase va former de l' $O_2^{\bullet-}$ à partir de l' O_2 , puis de l' H_2O_2 . La réaction de l' H_2O_2 avec du chlore a lieu par l'action de la MPO et donne de l'acide hypochloreux, un puissant bactéricide.

En plus de la mitochondrie et de la XO, la surproduction d' $O_2^{\bullet-}$ dans le muscle âgé et/ou inactif pourrait impliquer d'autres sources cellulaires dont la NADPH oxydase située dans le réticulum sarcoplasmique, les tubules transverses, le sarcolemme mais également dans les neutrophiles lors d'un état inflammatoire (Powers et al. 2011)(Encadré 4, Figure 3). Ces sources ne peuvent être exclues même si très peu d'informations sont actuellement disponibles sur leurs implications dans la surproduction d' $O_2^{\bullet-}$ observées dans le muscle âgé et/ou inactif.

Par ailleurs, il est important de souligner que l' $O_2^{\bullet-}$ produit par ces différentes sources au sein du tissu musculaire est rapidement converti en H_2O_2 en raison de sa courte demi-vie. Ce processus s'opère spontanément ou par l'action des enzymes superoxyde dismutases (SOD) (Halliwell and Gutteridge 2007) (Encadré 3). H_2O_2 est un oxydant moins réactif et avec une demi-vie plus longue. Il peut diffuser dans les différents compartiments cellulaires et au travers du sarcolemme (Halliwell and Gutteridge 2007). Ces propriétés permettent à H_2O_2 de réagir avec différentes molécules cellulaires et ainsi d'activer un grand nombre de voies de signalisation intracellulaire impliquées, entre autres, dans la sarcopénie (Veal et al. 2007).

2. Système antioxydant enzymatique

Les systèmes de défense antioxydants apparaissent clairement sollicités dans le muscle âgé pour lutter contre l'augmentation de la production d'ERDO précédemment décrite. En effet, une augmentation de l'activité enzymatique de la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) est généralement observée au sein du muscle âgé que ce soit chez l'homme (Pansarasa et al. 2000; Gianni et al. 2004; Marzani et al. 2005) et le rongeur (Oh-Ishi et al. 1995; Hollander et al. 2000) (Encadré 5, Figure 1). L'avance en âge engendre également une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) chez l'homme (Pansarasa et al. 1999; Gianni et al. 2004) et le rongeur (Ji et al. 1990; Leeuwenburgh et al. 1994). En agissant en synergie, ces adaptations pourraient constituer un mécanisme de défense pour prendre en charge la surproduction mitochondriale d' $O_2^{\bullet-}$ (Encadré 3). Néanmoins, ces adaptations semblent dépendantes de la typologie musculaire. En effet, les travaux menés chez l'animal ont permis de montrer que les augmentations des activités de la GPx et de la MnSOD s'observaient préférentiellement dans les muscles à typologie oxydative comme le soléaire (Leeuwenburgh et al. 1994; Oh-Ishi et al. 1995; Hollander et al. 2000). La surproduction d'ERDO mitochondriale observée avec l'âge dans ce type de muscle pourrait expliquer ces adaptations spécifiques (Drew et al. 2003; Capel et al. 2004). Des études se sont davantage intéressées à l'activité des enzymes antioxydantes cytosoliques, démontrant notamment que l'activité de la catalase était augmentée dans le muscle âgé (Leeuwenburgh et al. 1994; Pansarasa et al. 1999). Concernant l'activité de la cuivre-zinc superoxyde dismutase (CuZnSOD), les résultats apparaissent plus contradictoires. En effet, si certaines études ont rapporté une activité supérieure de la CuZnSOD dans

le tissu musculaire de rats âgés (Oh-Ishi et al. 1995; Hollander et al. 2000), les études menées chez l'homme n'observent généralement aucune modification (Gianni et al. 2004; Marzani et al. 2005).

L'inactivité semble au contraire induire une adaptation préférentielle des enzymes antioxydantes cytosoliques. En effet, une période d'inactivité radicale chez le rongeur est associée à une augmentation de l'activité de la CuZnSOD et de la catalase dans le muscle soléaire (Kondo et al. 1993a; Kondo et al. 1993b; Lawler et al. 2003; Servais et al. 2007), alors qu'aucune modification de l'activité de la MnSOD et de la GPx n'est constatée (Kondo et al. 1993a; Selsby and Dodd 2005; Servais et al. 2007) (Encadré 7). Ces résultats suggèrent que la surproduction d' $O_2^{\circ-}$ liée à l'inactivité impliquerait davantage le compartiment cytosolique.

3. Système de défense non-enzymatique

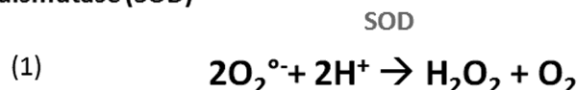
Le glutathion réduit (GSH) est le thiol non protéique le plus abondant dans les cellules musculaires. Il participe à la réduction de l' H_2O_2 en eau en constituant le substrat privilégié de la GPx, mais peut également piéger spontanément certaines espèces radicalaires (Encadré 5, Figure 2). L'avance en âge altère les concentrations en GSH dans de nombreux tissus de l'organisme (Vina et al. 1992). Concernant le tissu musculaire, le contenu en GSH est augmenté avec l'âge dans les muscles à prédominance oxydative (Leeuwenburgh et al. 1994; Chen et al. 2008) mais n'est pas affecté dans les muscles au profil davantage glycolytique (Leeuwenburgh et al. 1994; Bejma and Ji 1999; Mosoni et al. 2004; Vasilaki et al. 2006a). Pourtant, l'avance en âge conduit à la fois à une surproduction d'ERDO et à une augmentation l'activité de la GPx au sein du tissu musculaire suggérant que les concentrations en GSH devraient y être réduites (Encadré 5). L'augmentation ou le maintien du GSH musculaire pourrait dans ce cas s'expliquer par une augmentation de la biosynthèse du GSH via différentes enzymes comme la γ -glutamyl transférase (Chen et al. 2010).

Même si un certain nombre d'études reconnaissent qu'un statut déficient en vitamines C, E ou carotènes constituerait un facteur favorisant le développement de la sarcopénie (Semba et al. 2003), les effets de l'âge et de l'inactivité sur les concentrations musculaires en vitamines antioxydantes ne sont pas encore clairement établis (Starnes et al. 1989; van der Loo et al. 2003)(Encadré 5, Figure 2). Davantage de travaux se sont focalisés sur les effets de la supplémentation en vitamines antioxydantes comme moyen de prévention de la sarcopénie. Globalement, les supplémentations en vitamines E et C semblent exercer un effet bénéfique sur la masse et la force musculaire du muscle âgé (Ryan et al. 2010a) comme inactif (Appell et al. 1997; Servais et al. 2007), même si certaines études ne constatent aucun bénéfice (Ikemoto et al. 2002). Davantage de travaux apparaissent donc clairement nécessaires pour établir l'implication des vitamines antioxydantes dans la sarcopénie.

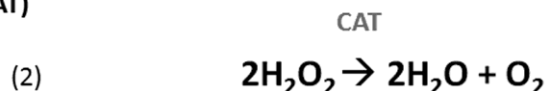
Encadré 5. Systèmes antioxydants

Figure 1. Réactions des principales enzymes antioxydants

La superoxyde dismutase (SOD)



La catalase (CAT)



La glutathion peroxydase (GPx)

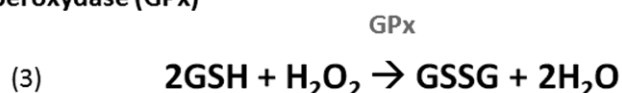
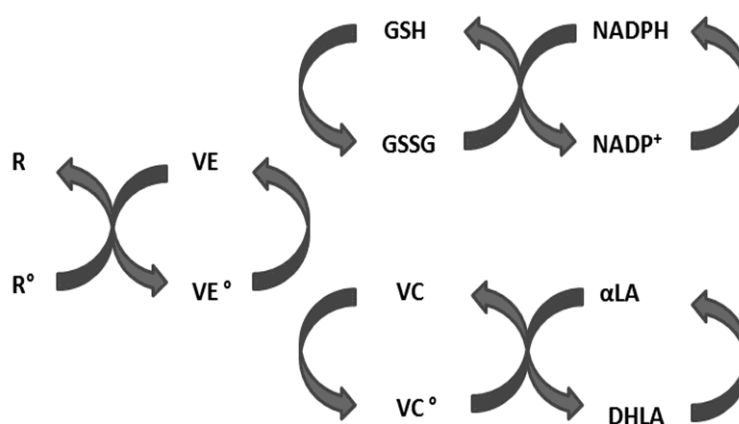


Figure 2. Principal réseau de défense antioxydante non-enzymatique impliquant les vitamines C, E, le glutathion, le NADPH et l'acide α -lipoïque



R° : espèces radicalaires ; VE : vitamine E ; VE° : vitamine E oxydée, VC : vitamine C ; VC° : vitamine C oxydée; GSSG : glutathion oxydé ; GSH : glutathion réduit ; αLA : acide lipoïque ; DHLA : acide dihydrolipoïque ; NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

4. Système de défense secondaire

Les systèmes secondaires agissent quand les ERDO n'ont pu être éliminés, soit parce que les systèmes antioxydants enzymatique et non-enzymatique ne fonctionnent pas ou mal (déficience congénitale ou acquise), soit parce qu'ils sont débordés (en présence d'une production excessive de ERDO). Les ERDO alors produits vont s'attaquer à tous les constituants cellulaires et provoquer des altérations plus ou moins graves. Certains dommages sont parfois réversibles et peuvent être pris en charge par des systèmes réparateurs. Par exemple, des enzymes comme la thiorédoxine (Trx) ou de la méthionine sulfoxyde reductase (Msr) sont capables de réparer certains dommages oxydatifs au niveau protéique comme l'oxydation de la méthionine ou de la cystéine (Ugarte et al. 2010). Cependant, l'avance en âge et l'inactivité sont associées à une réduction de l'expression musculaire de ces enzymes suggérant donc que le fonctionnement de ce système de réparation est altéré dans ces conditions (Matsushima et al. 2006; Rohrbach et al. 2006). Les dommages oxydatifs au niveau de l'ADN peuvent également être pris en charge par certaines enzymes comme l'oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) (Bohr et al. 2002). Même si peu de travaux sur le sujet sont disponibles, il semblerait que l'avance en âge soit également responsable d'une réduction de l'activité de OGG1 au sein du tissu musculaire (Koltai et al. 2010).

Les dommages oxydatifs sont dans d'autres cas irréversibles et les composants cellulaires endommagés doivent être éliminés afin d'éviter des dommages cellulaires plus importants. Dans le cas des protéines, les systèmes protéolytique et autophagique vont assurer cette élimination (Altérations du turnover protéique, page 37). Le fonctionnement de ces systèmes est optimisé par les protéines de choc thermique (HSPs). Ces protéines de stress, exprimées dans tous les compartiments cellulaires, fonctionnent comme des molécules chaperones facilitant le repliement des protéines, prévenant l'agrégation protéique et ciblant les protéines mal repliées afin qu'elles soient dégradées. Les protéines HSP sont classées en différentes familles selon leur poids moléculaire. Ainsi, on retrouve les petites HSPs (16–30 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP110 (Morton et al. 2009). Les données concernant les effets de l'âge sur l'expression musculaire des protéines HSPs sont controversées, certaines études observant une augmentation (Siu et al. 2006; Thalacker-Mercer et al. 2010) alors que d'autres aucune modification (Vasilaki et al. 2006b; Gupte et al. 2008). Néanmoins, il est démontré que l'augmentation de l'expression des protéines HSP en réponse à un stress musculaire générant une surproduction d'ERDO est limitée avec l'avance en âge suggérant donc une plus faible capacité d'adaptations du muscle âgé (Vasilaki et al. 2003; Murlasits et al. 2006; Vasilaki et al. 2006b).

5. Dommages oxydatifs

En dépit des adaptations des systèmes de défense antioxydants chez un individu souffrant de sarcopénie, la surproduction d'ERDO associée à l'âge ou à l'inactivité devient trop importante et induit une augmentation de la dégradation de certains constituants cellulaires au sein du tissu musculaire.

Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une oxydation des acides gras insaturés de l'ensemble de la cellule, touchant tout particulièrement ceux qui constituent la membrane plasmique (Encadré 6, Figure 1). L'avance en âge est clairement associée à une élévation des marqueurs de la peroxydation lipidique (MDA, 4-HNE, TBARS, isoprostanes) au sein du tissu musculaire que ce soit chez l'homme (Mecocci et al. 1999; Pansarasa et al. 1999; Marzani et al. 2005) ou chez le rongeur (Leeuwenburgh et al. 1994; Gunduz et al. 2004; Lambertucci et al. 2007). Il semblerait que cette peroxydation lipidique soit plus importante dans les muscles de type oxydatif que glycolytique (Lawler et al. 1993; Leeuwenburgh et al. 1994). L'inactivité radicale induit également une élévation de la peroxydation lipidique dans le tissu musculaire de rongeurs adultes (Kondo et al. 1993a; Lawler et al. 2003; Servais et al. 2007) comme âgés (Siu et al. 2008). Plus récemment, Rosa et al. (2005) ont démontré que des souris âgées sédentaires présentaient des niveaux de peroxydation lipidique musculaires supérieurs à leurs homologues de même âge utilisant une roue d'activité. Ces derniers résultats suggèrent donc fortement que l'inactivité pourrait accélérer la peroxydation lipidique musculaire observée avec l'avance en âge.

Carbonylation des protéines

Les ERDO peuvent s'attaquer aux protéines en endommageant leur structure tertiaire, en les fragmentant, en oxydant les résidus thiols et en altérant différents acides aminés. Parmi les différentes formes d'oxydation, la carbonylation (ajout d'un groupe carbonyle, C=O) est l'une des plus étudiées et traduit l'oxydation irréversible qui touche principalement l'arginine, la théonine, la proline et la lysine. La majorité des études menées chez l'homme montre que le contenu total en protéines carbonylées augmente dans le muscle âgé (Pansarasa et al. 1999; Fano et al. 2001). Chez le rongeur, les résultats diffèrent en fonction des techniques d'analyses employées (Encadré 6, Figure 2). En effet, les protéines carbonylées étaient quantifiées dans un premier temps de manière globale par spectrophotométrie. Les études s'appuyant sur cette technique ne constataient aucun effet de l'âge sur le contenu total ou mitochondrial (Capel et al. 2004; Mosoni et al. 2004). Par la suite, la mise au point de la détection des protéines carbonylées par Western Blotting a permis d'affiner l'analyse en différenciant les protéines carbonylées en fonction de leur poids moléculaire. Les études utilisant cette technique observent une nette augmentation de la carbonylation de certaines protéines au sein du tissu musculaire (Bota et al. 2002; Koltai et al. 2010). Plus récemment, la mise au point de techniques de

détection par électrophorèse 2D couplée à la spectrophotométrie de masse a permis d'identifier les protéines spécifiquement carbonylées avec l'âge (Encadré 6). Il a ainsi été constaté que les protéines mitochondriales constituaient une cible privilégiée de la carbonylation dans le muscle âgé (Feng et al. 2008). Il a également été observé qu'un plus grand nombre de protéines apparaissaient carbonylées avec l'âge dans les fibres de type II (Feng et al. 2008). Par ailleurs, il semblerait qu'une période d'inactivité radicale conduise également à une augmentation du contenu en protéines carbonylées dans le muscle de rongeurs (Koesterer et al. 2002; Selsby et al. 2007). L'implication de l'inactivité dans la carbonylation des protéines au sein du muscle âgé semble importante puisque certains travaux démontrent que des souris sédentaires présentent des concentrations musculaires de protéines carbonylées supérieures à leurs homologues de même âge bénéficiant utilisant une roue d'activité (Figueiredo et al. 2009).

Nitrotyrosination des protéines

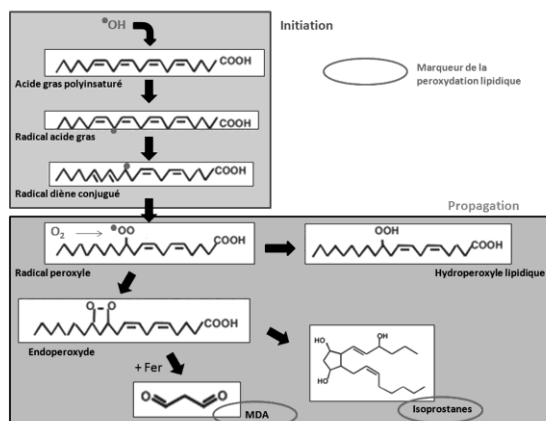
Même si il est moins étudié que la carbonylation des protéines, la 3-nitrotyrosine (3-NT) est aussi un marqueur de dommages protéiques et témoignant de la nitrotyrosination des protéines. Il se forme lorsque la tyrosine est nitrée par le peroxynitrite (ONOO⁻). Plusieurs travaux ont montré que l'avance en âge causait une augmentation de la nitration de certaines protéines musculaires essentielles pour la contraction comme la créatine kinase ou SERCA2 (Fugere et al. 2006; Nuss et al. 2009).

Oxydation des acides nucléiques

L'avance en âge est également associée à une augmentation des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN dans le muscle (Encadré 6, Figure 3). Un grand nombre d'études ont en effet montré que le contenu en 8-oxo-déoxyguanosine (8-OHdG) était supérieur dans le tissu musculaire âgé que ce soit chez l'homme (Mecocci et al. 1999; Fano et al. 2001) ou le rongeur (Sohal et al. 1994; Hamilton et al. 2001; Radak et al. 2002). Ces dommages semblent toucher tout particulièrement l'ADN mitochondrial (ADNmt), probablement en raison de l'importante surproduction mitochondriale d'ERDO dans le tissu musculaire âgé. En effet, il a été reporté que le niveau de bases oxydées était 2 à 3 fois plus important au niveau du l'ADN mitochondrial que de l'ADN nucléaire, et ce malgré une capacité de réparation de l'ADN supérieure dans la mitochondrie (Stevnsner et al. 2002). C'est un des facteurs majeurs impliqué dans les dysfonctionnements mitochondriaux se développant avec l'âge. A notre connaissance, une seule étude s'est intéressée aux effets de l'inactivité radicale sur l'oxydation des acides nucléiques dans le tissu musculaire. Hofer et al. (2008) ont ainsi constaté qu'une période d'immobilisation n'entraînait pas de modification du contenu en 8-OHdG dans le tissu musculaire de rats jeunes comme âgées. Cependant, ces auteurs ont montré que le contenu en 8-oxo-guanosine (8-OHG), marqueur de l'oxydation de l'ARN, était augmenté en réponse à l'inactivité radicale et que cette réponse était amplifiée dans le tissu musculaire âgé.

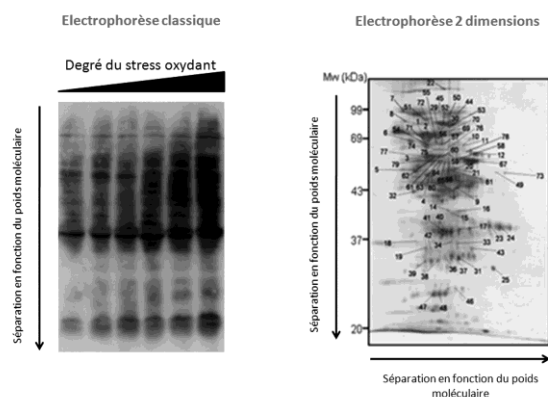
Encadré 6. Marqueurs des dommages oxydatifs

Figure 1. Peroxydation lipidique



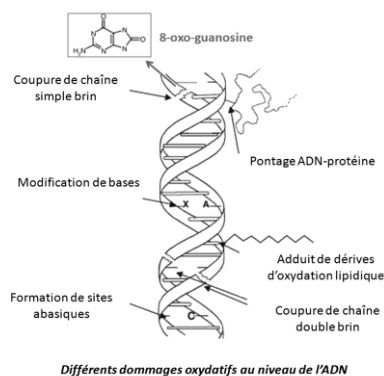
La **peroxydation lipidique** regroupe l'ensemble des réactions entre un radical libre et des acides gras polyinsaturés (AGPI). La peroxydation des AGPI implique 3 processus : la phase d'initiation, de propagation et de terminaison. La phase d'initiation correspond à la création d'un radical acide gras à partir d'un acide gras, ceci par l'abstraction d'un atome d'hydrogène. Le radical d'acide gras subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner une structure de diène conjugué, plus stable. Lors de la phase de propagation, le radical acide gras se transforme en radical peroxy (ROO^\bullet) par addition de molécule d'oxygène au niveau de son carbone-centré. Ce radical peroxy est suffisamment réactif pour soustraire à nouveau un atome d'hydrogène à un second AGPI ce qui aboutit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (ROOH). Le ROOH formé peut être rapidement oxydé en présence de fer ou de cuivre, ce qui aboutit notamment à la formation d'aldéhydes et d'alcènes. La phase de terminaison interrompt heureusement ces réactions en chaîne par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé plus stable, ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Schéma d'après Favier (1997))

Figure 2. Oxydation des protéines



Les protéines peuvent subir une oxydation de leurs acides aminés les plus sensibles comme la cystéine, la valine, la phénylalanine et la méthionine. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement thiol ($-\text{SH}$). L'oxydation de ce groupement aboutit à la formation de ponts dissulfures ou à des dérivés chimiques non réversibles conduisant notamment à une modification de la structure tertiaire de la protéine (Davies and Delsignore 1987). En subissant d'importantes modifications de leur conformation, les protéines oxydées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc progressivement éliminées (Yu 1994). Par ailleurs, l'oxydation de certains acides aminés aboutit à la formation de groupements carbonyles (protéine- $\text{C}=\text{O}$). Les protéines carbonylées sont ainsi des éléments couramment étudiés, notamment par Immunoblotting en 1 ou 2 dimensions (voir ci-contre).

Figure 3. Oxydation des acides nucléiques



Les ADN nucléaire et mitochondrial ainsi que l'ARN constituent également une cible du SO . Parmi les 5 composants de l'ADN, la thymine et la cytosine sont les plus susceptibles de subir des dommages oxydatifs, suivis de l'adénine, la guanine et les molécules de désoxyribose (ADN) et de ribose (ARN) (Yu 1994). Les lésions oxydatives des acides nucléiques peuvent entraîner des dysfonctions dans la multiplication cellulaire ainsi que des anomalies transcriptionnelles et traductionnelles. La principale technique utilisée pour mesurer l'oxydation des acides nucléiques repose sur le dosage de composés formés par l'hydroxylation des bases : le 8-oxo-déoxyguanosine (8-OHdG) pour l'ADN et la 8-oxo-oxyguanosine (8-OHG) pour l'ARN.

Encadré 7. Stress oxydant associé au vieillissement et à l'inactivité

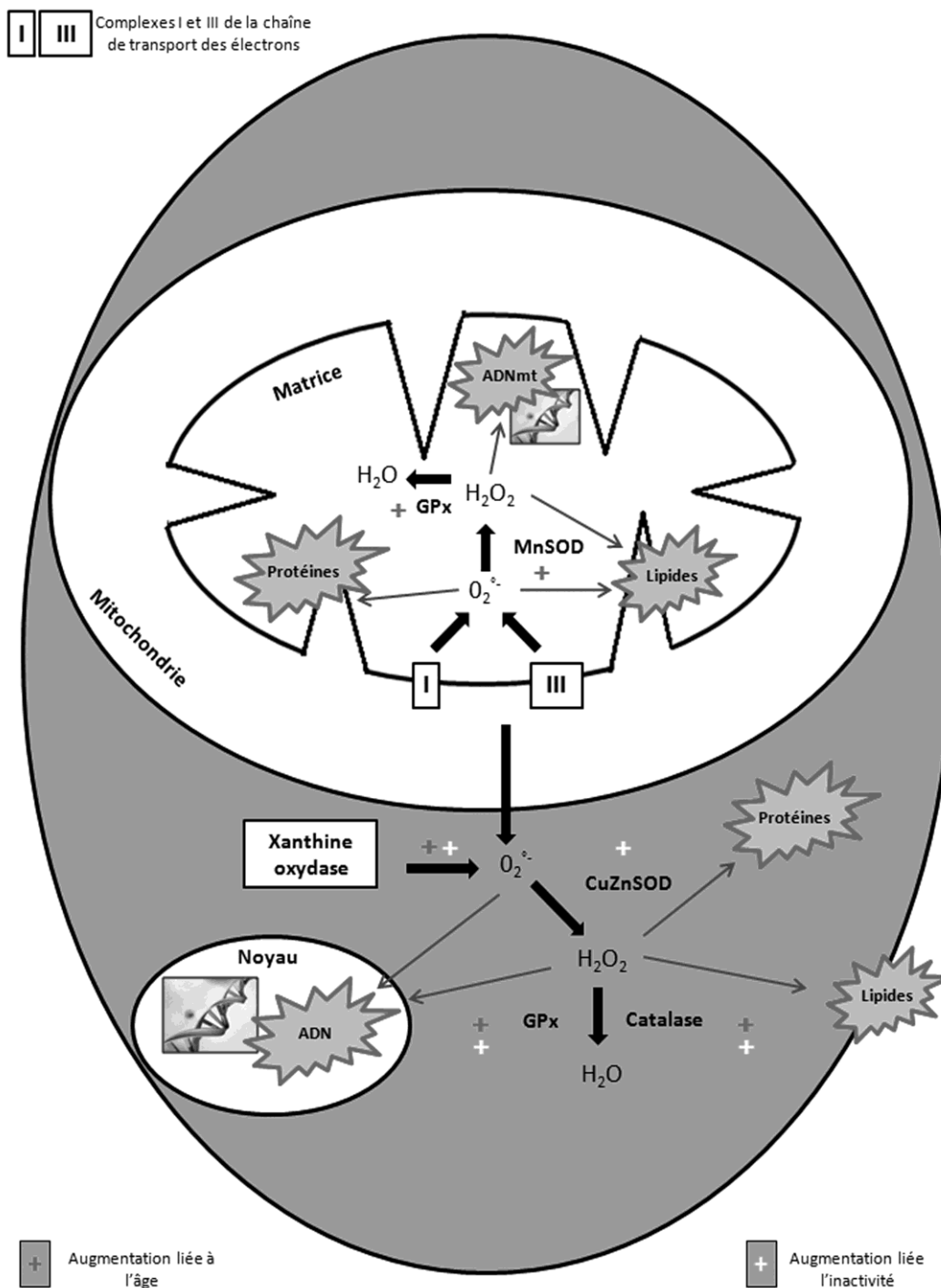


Schéma récapitulatif des effets de l'âge et de l'inactivité sur le stress oxydant dans le tissu musculaire. Les signes (+) blanc et noir symbolisent l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes avec l'âge ou l'inactivité. Les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons ainsi que la xanthine oxydase semblent constituer les principales sources d'ERDO dans le tissu musculaire durant le vieillissement ou l'inactivité.

C. Potentiels rôles du stress oxydant dans les mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie

Les travaux menés principalement sur des modèles cellulaires suggèrent que la surproduction d'ERDO dans le muscle âgé ou inactif pourrait affecter plusieurs mécanismes cellulaires responsables de l'atrophie musculaire. Cette surproduction d'ERDO pourrait également être à l'origine de la détérioration de la force musculaire, et ce indépendamment de l'atrophie musculaire.

1. Rôle des ERDO dans la dégradation protéique

Les ERDO favorise la dégradation protéique en stimulant à la fois la protéolyse et l'autophagie qui représentent les deux modes principaux de dégradation des protéines (Altérations du turnover protéique, page 37). En effet, de récents travaux menés sur myotubes ont démontré que les ERDO stimulent l'activation du système ubiquitine-protéasome dépendante en stimulant l'expression et l'activité des ubiquitine ligases E3 MAFbx et MuRF1 responsables du marquage des protéines pour être dégradées (Li et al. 2003; Clarke et al. 2007). La surproduction d'ERDO induit une augmentation de l'oxydation des protéines ce qui participe également à leur dégradation. En effet, les protéines oxydées constituent des cibles préférentielles pour l'ubiquitination et la dégradation via le protéasome 26S (Jung et al. 2007). Mais la dégradation des protéines oxydées peut se faire aussi indépendamment du système ubiquitine-protéasome 26S via le cœur catalytique 20S du protéasome qui ne nécessite pas d'ubiquitination préalable (Grune et al. 2003). En effet, les dommages oxydatifs induisent une modification de la structure protéique conduisant au déploiement de la protéine et à l'augmentation de sa surface hydrophobe (Bader and Grune 2006). En raison de la préférence du protéasome 20S pour les acides aminés hydrophobes, les protéines oxydées vont donc être tout spécialement susceptible à la dégradation par le protéasome 20S (Hansen et al. 2007b). Bien que le rôle du stress oxydant dans la dégradation protéique n'ait été mis en évidence qu'en culture cellulaire, l'ensemble de ces travaux suggère néanmoins que le stress oxydant chronique au sein du tissu musculaire âgé et/ou inactif favoriserait l'atrophie musculaire en stimulant la dégradation protéique.

2. Rôle des ERDO dans la régénération musculaire

La sarcopénie peut s'expliquer en partie par des altérations au niveau de la régénération musculaire (Altérations de la régénération musculaire, page 35). Ce potentiel de régénération est réduit avec l'âge en raison à la fois de la diminution du pool de cellules satellites (SC) (Renault et al. 2002; Kadi et al. 2004), mais également des altérations de leurs capacités de prolifération et de différenciation (Le Grand and Rudnicki 2007). De nombreux travaux considèrent que l'environnement cellulaire du muscle âgé est responsable des altérations de l'activité des SC plus que le potentiel myogénique intrinsèque des SC âgées elles même (Carlson and Faulkner 1989; Carlson et al. 2009).

Ainsi, des études récentes ont démontré au sein de cellules C2C12 que la réduction de l'environnement redox favorisait à la fois la prolifération (Renault et al. 2002) et la différenciation des myoblastes (Ardite et al. 2004; Hansen et al. 2007a) soulignant l'importance des ERDO dans ces processus.

Certaines études ont également suggéré que la diminution de l'activité des SC dans le muscle âgé pourrait être en lien avec l'augmentation du stress oxydant au sein même des SC (Fulle et al. 2005). En effet, ces travaux ont évalué l'évolution du stress oxydant in vitro dans des SC quiescentes et des myoblastes issus de vaste latéral d'hommes jeunes (de 30 à 40 ans) et âgés (70 à 90 ans). Ils ont ainsi constaté que les activités d'enzymes antioxydantes (CAT et Glutathion transférase) étaient diminuées avec l'âge aussi bien dans les SC quiescentes que les myoblastes (Fulle et al. 2005). Cette même équipe a montré plus récemment que les niveaux de MDA étaient supérieurs après 7 jours de différenciation dans des myotubes issus des SC âgées comparés à des myotubes issus de SC jeunes, cette augmentation étant associée à une baisse de la capacité de fusion des myoblastes pour former des myotubes (Beccafico et al. 2007). Ensemble, ces résultats suggèrent donc que l'augmentation avec l'âge du stress oxydant au sein même des SC pourrait également être à l'origine de la réduction de leur activité.

3. Rôle des ERDO dans les altérations des qualités contractiles du muscle

La diminution de la force musculaire observée dans le muscle âgé ne s'explique pas seulement par l'atrophie musculaire mais également par des altérations des qualités contractiles (Mécanismes impliqués dans les altérations des qualités contractiles du muscle, page 42). Même si cela n'a pas été directement démontré, il est fort probable que les ERDO puissent jouer un rôle important dans ces altérations. Les ERDO sont en effet reconnus comme impliqués dans la régulation de la force musculaire (Reid 2008). A des concentrations basales faibles, les ERDO sont essentiels pour la contraction musculaire et permettent d'améliorer la force maximale du muscle lorsque leurs concentrations musculaires sont augmentées (Reid 2001). Néanmoins, la contraction est au contraire altérée lorsque ces concentrations en ERDO vont devenir trop importantes (Reid 2001). Un muscle, dont les concentrations en ERDO sont élevées, développera ainsi une fatigue plus précoce qu'un muscle avec des concentrations plus faibles (Reid et al. 1993). Dans ces conditions, il semble logique que soit constatée une fatigue plus précoce dans le tissu musculaire âgé en raison de la production supérieure d'ERDO (Lawler et al. 1997). Les cibles cellulaires et moléculaires à l'origine de la détérioration de la force musculaire en cas de surproduction d'ERDO sont encore mal connues. Il a été suggéré que les ERDO à hautes concentrations pouvaient nuire à la libération du calcium intracellulaire ou à la sensibilité au calcium des myofilaments contractiles (Smith and Reid 2006;

Zima and Blatter 2006). Des protéines transmembranaires impliquées dans le couplage excitation-contraction comme SERCA et VDAC pourraient constituer ainsi des cibles privilégiées de la nitration (Thompson 2009).

D. Pour résumer...

L'âge tout comme l'inactivité radicale sont associés à une augmentation de la production O_2^{\bullet} et d' H_2O_2 au sein du tissu musculaire (Bejma and Ji 1999; Capel et al. 2005; Vasilaki et al. 2006a; Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). Certains travaux ont montré que les dysfonctions mitochondriales pouvaient jouer un rôle essentiel dans cette surproduction musculaire d'ERDO (Capel et al. 2004; Kavazis et al. 2009; Xu et al. 2010). **L'augmentation de l'activité de la xanthine oxydase dans le muscle âgé ou inactif ont été observées dans un certain nombre de travaux (Lambertucci et al. 2007; Hofer et al. 2008), mais il reste à démontrer que cette source cellulaire d'ERDO joue un rôle majeur ou non dans la surproduction d'ERDO musculaire et quel est son impact dans le développement de la sarcopénie.**

En dépit des adaptations des systèmes de défense antioxydants chez un individu souffrant de sarcopénie (Pansarasa et al. 1999; Hollander et al. 2000; Servais et al. 2007), la surproduction d'ERDO associée à l'âge et/ou à l'inactivité devient trop importante et induit une augmentation de la dégradation de certains constituants cellulaires au sein du tissu musculaire. Les membranes lipidiques, les protéines et les acides nucléiques constituent ainsi des molécules privilégiées subissant les attaques des espèces radicalaires (Marzani et al. 2005; Lambertucci et al. 2007; Hofer et al. 2008). Ces dommages traduisent un déséquilibre de la balance « oxydants-antioxydants », appelé communément stress oxydant, et peut être à l'origine de la perturbation d'un certain nombre de voies de signalisation intracellulaire. Les travaux menés en culture cellulaire ont montré que le stress oxydant stimulait plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans l'atrophie musculaire comme la protéolyse ou les altérations de la régénération musculaire. **Pour ces raisons, le stress oxydant chronique observé dans le muscle âgé et/ou inactif pourrait promouvoir ces mécanismes et favoriserait donc le développement de la sarcopénie. Néanmoins, le lien entre ces mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie et le stress oxydant demande à être clairement démontré *in vivo* au sein du tissu musculaire âgé. Ce lien pourrait être en partie assuré par des voies de signalisation intracellulaire impliquant des kinases, phosphatases ou facteurs de transcription redox-sensibles.**

Chapitre 3 : PGC-1 α , NF- κ B et p38 MAPK : des protéines sensibles au stress oxydant impliquées dans la sarcopénie ?

1. Implications du Nuclear factor- κ B dans la sarcopénie

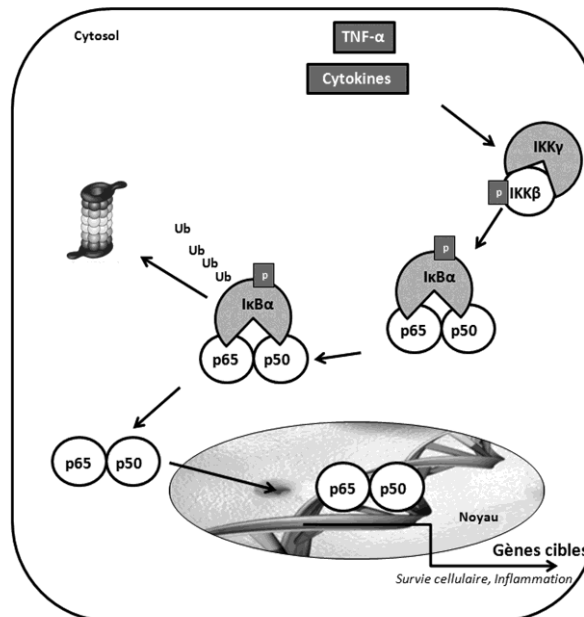
A. Généralités sur la voie de signalisation NF- κ B

Le terme NF- κ B fait référence à une famille de facteurs de transcription ubiquitaire qui régule un grand nombre de réponses cellulaires impliquées dans l'inflammation, le développement et l'apoptose (Hayden and Ghosh 2004). La famille NF- κ B est composée de 5 membres chez les mammifères : p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF- κ B1) et p52 (NF- κ B2). Les membres de la famille NF- κ B partagent un domaine homologue Rel (RHD) au niveau de leur extrémité N-terminale qui permet la fixation à l'ADN et la formation d'homo- ou d'hétérodimères. Néanmoins, les membres de la famille de NF- κ B diffèrent au niveau de leur extrémité C-terminale et en fonction de leur mode de synthèse. Ainsi, RelA/p65, RelB et c-Rel possèdent un domaine de transactivation (TAD) qui est nécessaire à l'action transcriptionnelle de NF- κ B et sont synthétisés sous leur forme mature. Au contraire, NF- κ B1/p50 et NF- κ B/p52 ne possèdent pas de domaine de transactivation et sont synthétisés par protéolyse à partir de leurs précurseurs respectifs, p105 et p100. La protéolyse de p105 en p50 est constitutive, tandis que celle de p100 en p52 est étroitement régulée et inducible (Hayden and Ghosh 2004).

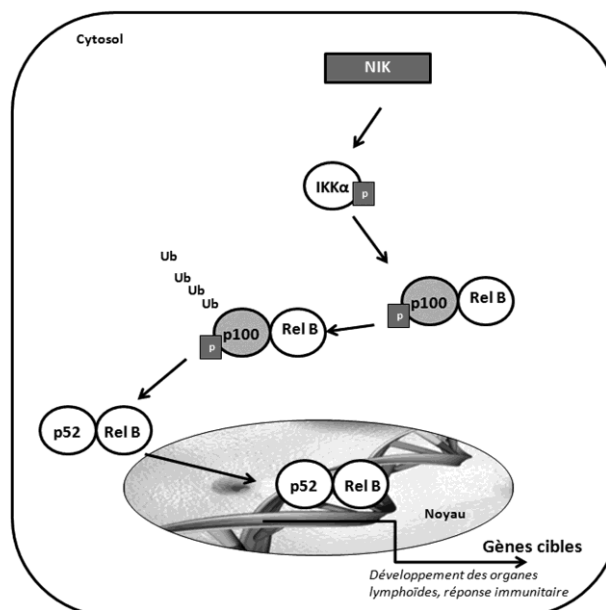
Différents membres de la famille NF- κ B se dimérisent pour faciliter la fixation de NF- κ B à l'ADN. Parmi ces membres, p50 et p65 forment un hétérodimère présent dans pratiquement toutes les cellules et responsable de l'augmentation de l'expression d'un certain nombre de gènes pro-inflammatoires impliqués dans la survie cellulaire. Les protéines p50 et p52 peuvent former également des homodimères ou hétérodimères mais qui ne possèdent pas de domaine d'activation transcriptionnel. Ces dimères se fixent tout de même sur les sites consensus de NF- κ B mais agissent comme des répresseurs transcriptionnels en bloquant ces sites consensus (Hayden and Ghosh 2008). Avant d'être activés, la plupart des dimères de NF- κ B sont séquestrés dans le cytosol par les protéines I κ B. La famille des I κ Bs est constituée de 7 membres : I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , BCL-3 auxquels il faut ajouter les deux précurseurs protéiques, p100 et p105, dont la dégradation partielle aboutira à la formation des protéines de p52 et p50. L'interaction des dimères de NF- κ B avec les I κ Bs a pour conséquence de masquer leur séquence de localisation nucléaire et permet donc le maintien de NF- κ B dans un état inactif dans le compartiment cytoplasmique (Hayden and Ghosh 2008).

Encadré 8. Voies de signalisation impliquant NF- κ B

Voie de signalisation classique



Voie de signalisation alternative



L'activation de NF- κ B peut se produire par des voies de signalisation classique ou alternative. La voie de signalisation classique implique l'activation d'IKK β conduisant à la phosphorylation puis la dégradation d'I κ B α . La voie de signalisation alternative implique IKK α et conduit à la phosphorylation du précurseur protéique p100, ce qui permet la formation par la suite d'un hétérodimère p52/RelB.

Le complexe NF- κ B est activé dans une cellule en réponse à divers stimuli tels que les infections virales et bactériennes ainsi qu'à l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance, mais aussi au stress oxydant (Kumar et al. 2004). Ces différents stimuli vont initier en aval l'activation de voies de signalisation impliquant diverses protéines kinases comme, entre autres, NF- κ B-inducing kinase (NIK), les MAPK, Akt kinase ou le TNF- α (Kumar et al. 2004; Hayden and Ghosh 2008). La plupart des ces voies de signalisation convergent vers le complexe I κ B kinase (IKK) composé de sous-unités catalytiques (IKK α et IKK β) et une sous-unité régulatrice (IKK γ). L'activation de NF- κ B va ensuite s'opérer via une voie classique ou alternative en fonction de la sous-unité du complexe IKK qui est impliquée. Ainsi, la voie d'activation classique de NF- κ B est IKK β dépendante et s'opère grâce à la dégradation des protéines I κ B (Encadré 8). La voie alternative d'activation dépend quant à elle de IKK α et de NIK impliquant un processus de régulation du précurseur protéique p100 (Kumar et al. 2004; Hayden and Ghosh 2008) (Encadré 8). Des travaux récents ont montré que selon le type de stimulus, l'activation chronique des voies classique comme alternative dans le tissu musculaire favoriserait l'atrophie musculaire (Cai et al. 2004; Hunter and Kandarian 2004).

Dans le cadre de la voie classique d'activation, IKK β est activé et induit une phosphorylation spécifique de la protéine inhibitrice I κ B. Cette phosphorylation d'I κ B conduit à son ubiquitination, et donc à sa dégradation par la voie du protéasome 26S. Le complexe NF- κ B libéré de I κ B peut ainsi se transloquer dans le noyau conduisant à l'activation d'un certain nombre de gènes cibles (Hayden and Ghosh 2004) (Encadré 8). En plus de cette voie classique d'activation de NF- κ B via la dégradation de I κ B, des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation ou l'ubiquitination sont reconnues comme modulant l'activation de NF- κ B (Schmitz et al. 2001; Hayden and Ghosh 2004). Ainsi, il a été démontré que IKK α jouait un rôle clé dans l'activation de NF- κ B en induisant la phosphorylation de la sous-unité p65 (Sizemore et al. 2002) (Encadré 8). Par ailleurs, il est important de souligner que l'activation de NF- κ B peut également être limitée au travers de divers mécanismes. L'un d'entre eux implique une boucle de régulation induisant la synthèse de nouvelles protéines I κ B qui se fixent sur le complexe NF- κ B dans le noyau, le retirent de l'ADN et l'exportent vers le cytosol (Schmitz et al. 2001; Hayden and Ghosh 2004).

B. Rôle des ERDO dans l'activation de NF- κ B

L'équipe du professeur Lester Packer fut la première à mettre en évidence au sein de cellules musculaires que le TNF- α induisait l'activation de NF- κ B dans des conditions pro-oxydantes (Sen et al. 1997). Plus précisément, ces derniers ont montré que l'activation de NF- κ B par le TNF- α était amplifiée au sein de myoblastes L6 exposés à une déplétion en GSH ou à des concentrations élevées

en H_2O_2 . Par la suite, d'autres travaux ont également observé que l'activité de NF- κ B ainsi que la phosphorylation d'I κ B α étaient augmentées dans des lignées cellulaires C2C12 exposés au H_2O_2 , mais qu'un prétraitement avec de la catalase prévenait ces augmentations (Li et al. 1998). Il semblerait d'ailleurs que les ERDO produits par la mitochondrie jouent probablement un rôle clé dans l'activation de NF- κ B. Li et al. (1999) ont en effet observé un blocage de l'activation de NF- κ B par le TNF- α lorsque des lignées cellulaires C2C12 étaient incubées en présence de roténone, un inhibiteur de la respiration mitochondriale. L'ensemble de ces travaux démontrent l'implication des ERDO dans l'activation de NF- κ B en culture cellulaire suggérant que la surproduction chronique d'ERDO puisse jouer un rôle dans la régulation de NF- κ B au sein du tissu musculaire âgé ou inactif. Des travaux s'appuyant sur des modèles expérimentaux *in vivo* de vieillissement et/ou d'inactivité apparaissent néanmoins nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

C. Rôles de NF- κ B dans le tissu musculaire

Les travaux menés lors de la dernière décennie ont permis d'identifier plusieurs importantes fonctions de NF- κ B dans la régulation de la masse musculaire qui pourrait jouer un rôle dans le développement de la sarcopénie. Il existerait ainsi 3 principaux mécanismes par lesquels l'activation chronique de NF- κ B conduirait à l'atrophie musculaire. L'activation chronique de NF- κ B favoriserait l'atrophie musculaire en intervenant sur les mécanismes de dégradation protéique, les processus inflammatoires mais aussi la régénération musculaire.

1. **Rôle dans la dégradation protéique**

La protéolyse des protéines est essentiellement régulée par le système ubiquitine-protéasome qui permet une dégradation sélective des protéines structurelles et de régulation (Altérations du turnover protéique, page 37). L'activation de NF- κ B en elle même nécessite une action protéolytique des protéines I κ B (I κ B α , p100 et p 105) via le système ubiquitine-protéasome. Néanmoins, de récents travaux ont montré que l'activation de NF- κ B pouvait également induire une augmentation de l'expression de certaines enzymes du système ubiquitine-protéasome impliquées dans la dégradation des protéines. En effet, Cai et al. (2004) ont démontré que la surexpression d'IKK β via des modèles de souris transgéniques provoquait une substantielle augmentation de l'expression du gène de l'ubiquitine ligase MuRF1. Mourkioti et al. (2006) ont eux utilisé une approche contraire pour étudier l'implication de NF- κ B dans l'expression des gènes protéolytiques. Ces derniers ont en effet observé que la délétion d'IKK β spécifiquement dans le muscle prévenait l'augmentation de l'expression de MuRF1 et l'atrophie lors d'une dénervation. Ces deux travaux suggèrent donc que l'activation de NF- κ B participe à l'atrophie musculaire, au moins en partie via l'augmentation de l'expression de l'ubiquitine ligase MuRF1 dans le tissu musculaire (Cai et al. 2004; Mourkioti et al. 2006).

2. Rôle dans l'inflammation musculaire

Un état inflammatoire chronique est l'une des principales causes de la sarcopénie qu'elle soit liée à l'âge, mais également au cancer ou à d'autres maladies inflammatoires (e.g SIDA). Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , ou encore les interleukines 1 β (IL-1 β) et 6 (IL-6) constituent en effet l'un des principaux facteurs à l'origine de l'atrophie musculaire associée aux maladies chroniques (Spate and Schulze 2004). Ainsi, des concentrations sériques et musculaires élevées de ces cytokines pro-inflammatoires ont été constatées chez les personnes âgées touchées par la sarcopénie (Visser et al. 2002; Schaap et al. 2009) ou chez des rongeurs inactifs (Smith et al. 2007; Andrianjafinony et al. 2010). Il est important de souligner que l'élévation de ces cytokines pro-inflammatoires inhibait l'expression et l'activité d'hormones clés de la croissance musculaire comme l'IGF-1 et la GH (Fernandez-Celemin et al. 2002). Par ailleurs, plusieurs chémokines, molécules d'adhérence cellulaire ou protéases extracellulaires stimulent l'infiltration des macrophages, lymphocytes et neutrophiles impliqués dans la réponse inflammatoire du tissu musculaire (Li et al. 2008).

Certaines études ont rapporté que NF- κ B régulait l'expression des molécules pro-inflammatoires précédemment évoquées (cytokines, chémokines et molécules d'adhérence cellulaire) (Kumar et al. 2004). Mais d'un autre côté, certaines de ces cytokines pro-inflammatoires (e.g TNF- α , IL-1 β , IL-6) peuvent elle-même favoriser l'activation NF- κ B constituant ainsi une boucle de régulation positive à l'origine d'une hyperstimulation de NF- κ B et du développement de dysfonctionnements musculaires (Kumar et al. 2004). Ces résultats suggèrent qu'inhiber l'activité de NF- κ B peut être un moyen efficace pour limiter l'atrophie musculaire observée avec l'âge et l'inactivité. Ce constat apparaît d'autant plus crédible que certaines études ont observé que la délétion spécifique d'IKK β prévenait l'atrophie musculaire en limitant la réponse inflammatoire et la fibrose musculaire (Mourkioti et al. 2006).

3. Rôle dans la régénération musculaire

Les dysfonctionnements du processus de régénération musculaire constituent un mécanisme central impliqué dans la sarcopénie (Altérations de la régénération musculaire, page 35). Un certain nombre de travaux suggèrent que NF- κ B favorise la prolifération des myoblastes et leur maintien dans un état indifférencié. En effet, l'activation de NF- κ B stimule l'expression et stabilise la protéine kinase cycline dépendante D1 dans le tissu musculaire conduisant à une augmentation de la prolifération des myoblastes et une inhibition de leur différenciation (Guttridge et al. 1999; Bakkar et al. 2008). De plus, l'activation de NF- κ B apparaît impliquée à la fois dans la déstabilisation de l'ARNm codant MyoD et dans sa dégradation protéique (Guttridge et al. 1999; Langen et al. 2004). Le MyoD est un facteur de transcription impliqué dans l'activation des SC (Encadré 2, Figure 1, page 38), mais

également dans la transition des myoblastes de l'état de prolifération à l'état de différenciation (Berkes and Tapscott 2005). L'effet inhibiteur de NF- κ B sur MyoD pourrait donc être à l'origine d'altérations du processus de différenciation dans le tissu musculaire. Par ailleurs, Langen et al. (2001) ont montré que l'activation de TNF- α et IL-1 β bloquaient la différenciation des myoblastes en myotubes. Cette étude montre également que ces effets inhibiteurs de TNF- α et IL-1 β étaient annulés lorsque la dégradation de I κ B α est bloquée mais également lorsque IKK β est surexprimé (Langen et al. 2001). Ces résultats suggèrent que l'état inflammatoire dans le muscle atrophié pourrait participer à expliquer l'activation de NF- κ B, et par conséquent l'altération de certains processus de la régénération musculaire favorisant l'atrophie musculaire.

D. Pour résumer...

Parmi l'ensemble des voies de signalisations cellulaires impliquées dans le développement de la sarcopénie, des travaux récents ont souligné l'importance du rôle du facteur de transcription NF- κ B. Le terme NF- κ B fait référence à une famille de facteurs de transcription ubiquitaire qui régule un grand nombre de réponses cellulaires impliquées dans l'inflammation, la régénération musculaire et l'apoptose (Hayden and Ghosh 2004). L'activation de NF- κ B peut se produire par des voies de signalisation classique ou alternative. La voie de signalisation classique implique l'activation d'IKK β conduisant à la phosphorylation puis la dégradation d'I κ B α . La voie de signalisation alternative implique IKK α et conduit à la phosphorylation du précurseur protéique p100, ce qui permet la formation par la suite d'un hétérodimère p52/RelB. **NF- κ B pourrait jouer un rôle important dans le développement de la sarcopénie puisqu'il stimule la protéolyse et pourrait être également à l'origine d'altérations du processus de régénération musculaire.** D'ailleurs, il a été démontré que réduire l'activité de NF- κ B au sein du tissu musculaire pouvait prévenir diverses formes d'atrophie liées à des dystrophies ou des cancers (Cai et al. 2004; Hunter and Kandarian 2004; Acharyya et al. 2007). **L'implication des ERDO dans l'activation de NF- κ B a été démontrée en culture cellulaire suggérant que la surproduction chronique d'ERDO pourrait jouer un rôle dans la régulation de NF- κ B au sein du tissu musculaire âgé ou inactif. Des travaux s'appuyant sur des modèles expérimentaux *in vivo* explorant la sarcopénie apparaissent néanmoins nécessaires pour confirmer cette hypothèse**

2. Implication de PGC-1 α dans la sarcopénie

A. Généralités sur PGC-1 α

Une grande attention est portée au co-activateur transcriptionnel peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α depuis sa découverte en 1998 par l'équipe du professeur Spiegelman, où il fut identifié comme un co-activateur de PPAR γ dans le tissu adipeux et le muscle (Puigserver et al. 1998). PGC-1 α est désormais reconnu comme impliqué dans la régulation de la thermogénèse, du métabolisme énergétique et d'autres processus biologiques essentiels dans le fonctionnement du tissu musculaire (Lin et al. 2005; Rodgers et al. 2008). PGC-1 α co-active et interagit avec une large gamme de facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires dont notamment le récepteur α aux œstrogènes (ERR α) (Huss et al. 2002), les récepteurs thyroïdiens (Puigserver et al. 1998), les facteurs respiratoires nucléaires (NRFs) (Wu et al. 1999) ou encore le myocyte enhancer factor 2 (MEF2) (Handschin et al. 2003). Ces différentes fonctions confèrent à PGC-1 α un rôle central dans la régulation des gènes nucléaires et mitochondriaux nécessaires aux adaptations contractiles et métaboliques du tissu musculaire (Puigserver and Spiegelman 2003; Scarpulla 2008).

B. Régulation de PGC-1 α dans le tissu musculaire

1. Expression de PGC-1 α

L'exercice physique est reconnu comme le principal responsable de l'augmentation de l'ARNm et du contenu protéique de PGC-1 α au sein du tissu musculaire que ce soit chez l'homme ou le rongeur (Baar et al. 2002; Wright et al. 2007b; Little et al. 2011; Safdar et al. 2011). Cette augmentation de l'expression de PGC-1 α au sein du tissu musculaire semble impliquer plusieurs mécanismes intracellulaires, mais également certains mécanismes hormonaux indépendants de la contraction musculaire.

Rôle du calcium

Les travaux *ex vivo* et *in vivo* menés chez le rat ou des souris transgéniques ont fourni la preuve que les concentrations cytosoliques en calcium jouaient un rôle clé dans l'augmentation de l'expression de PGC-1 α dans le muscle en contraction (Irrcher et al. 2003; Wright et al. 2007a). Par ailleurs, il a été démontré que l'incubation de cellules musculaires de rats avec de l'ionomysine (un ionophore de calcium) ou de la caféine augmentait l'ARNm de PGC-1 α (Ojuka et al. 2003; Kusuhara et al. 2007), alors que des inhibiteurs de la calcineurine et Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK) prévenaient cette augmentation (Kusuhara et al. 2007). L'implication des voies de signalisation calcique dans la régulation de l'expression de PGC-1 α a par ailleurs été confirmée chez

des souris transgéniques exprimant de manière constitutive des formes actives de calcineurine ou de CAMKIV (Wu et al. 2002) (Figure 6).

Rôle de l'AMP Kinase

La contraction musculaire diminue les niveaux d'ATP et augmente ceux d'ADP dans les cellules musculaires. Cela a pour conséquence de modifier le rapport ATP/ADP et stimuler l'activité métabolique dans le muscle. Ces changements du statut énergétique cellulaire sont à l'origine de l'activation de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (Bergeron et al. 2001). Ce senseur énergétique serait impliqué dans la régulation de l'expression de PGC-1 α . Un certain nombre de travaux ont effet démontré chez des rongeurs que l'injection d'AICAR, un analogue de l'AMP capable d'activer l'AMPK, induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm de PGC-1 α (Jorgensen et al. 2005; Narkar et al. 2008; Leick et al. 2010a) (Figure 6). En s'appuyant sur des souris KO des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ d'AMPK, Jorgensen et al. (2005) ont plus spécifiquement montré que l'augmentation de l'expression de PGC-1 α se faisait via l'AMPK $\alpha 1$ suite à un exercice ou une injection d'AICAR.

Rôle de la p38 MAPK

La contraction musculaire entraîne l'activation de la voie de signalisation impliquant la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Aronson et al. 1997; Widegren et al. 1998). Cette famille est elle-même sous divisés en 3 sous-famille de kinases : JNK/SAPK, ERK et p38 MAPK. Parmi celles-ci, la p38 MAPK apparaît impliquée dans la régulation de PGC-1 α . En effet, plusieurs travaux ont montré que l'activation de la p38 MAPK conduisait à la phosphorylation et à l'augmentation de l'expression de PGC-1 α dans différents tissus de l'organisme dont le muscle (Zhao et al. 1999; Puigserver et al. 2001; Cao et al. 2004) (Figure 6). Plus récemment, Akimoto et al. (2005) ont observé que la p38 MAPK agissait via la phosphorylation d'ATF2 pour augmenter l'expression de PGC-1 α au sein du tissu musculaire (Figure 6). En s'appuyant sur des souris exprimant une forme dominante négative d'ATF2, cette même équipe a spécifiquement démontré que le contrôle transcriptionnel de PGC-1 α dans le muscle en réponse à une stimulation électrique nécessitait une interaction d'ATF2 avec le site promoteur de PGC-1 α (Akimoto et al. 2008). Ces études fournissent donc des preuves évidentes de l'implication de la p38 MAPK dans la régulation de l'expression de PGC-1 α au sein du tissu musculaire. Ce point sera encore détaillé dans la partie « Rôle de la p38 MAPK dans le tissu musculaire » (page 76).

Contrôle hormonal

Il semble exister également un contrôle hormonal de l'expression de PGC-1 α . En effet, des augmentations de l'expression de l'ARNm de PGC-1 α dans le tissu musculaire de souris ont été rapportées après des injections de clenbutérol (Miura et al. 2007; Chinsomboon et al. 2009), suggérant

une implication des récepteurs β -adrénergiques dans la régulation de l'expression PGC-1 α . Il semblerait que cet effet se fasse via les récepteurs β 2-adrénergiques mais ne concerne pas les β 1 et β 3 (Miura et al. 2007). Par ailleurs, un certain nombre de travaux ont également observé chez le rongeur qu'un traitement en hormones thyroïdiennes augmentait l'expression de PGC-1 α dans le muscle squelettique (Irrcher et al. 2003; Bahi et al. 2005; Koulmann et al. 2008). Cette action se ferait via l'activation de l'AMPK et de la p38 MAPK (Irrcher et al. 2003; Bahi et al. 2005) (Figure 6).

L'expression de PGC-1 α dans le tissu musculaire apparaît donc régulée par un grand nombre de facteurs parmi lesquels la signalisation calcique, l'AMPK, la p38 MAPK, les récepteurs β -adrénergiques ou encore les hormones thyroïdiennes. L'ensemble de ces facteurs (hormis les hormones thyroïdiennes) peut être modifié par l'exercice physique et peut donc potentiellement moduler l'expression de PGC-1 α dans le tissu musculaire (Figure 6). Par ailleurs, il est important de souligner que l'expression de PGC-1 α peut être régulée par PGC-1 α lui-même via son interaction avec MEF2 et son propre site promoteur dans une boucle d'auto-régulation (Handschin et al. 2003). Un tel mécanisme pourrait participer à amplifier l'augmentation de l'expression de PGC-1 α lorsqu'elle se produit (Figure 6).

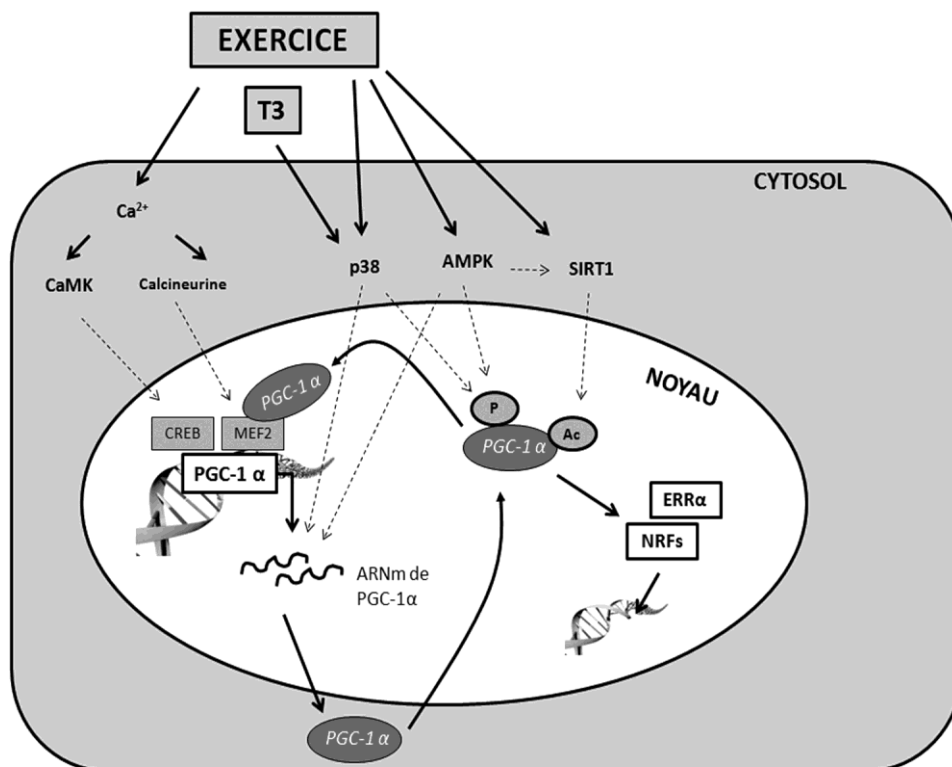


Figure 6. Représentation schématique des différentes voies d'activation de PGC-1 α suggérées au sein du tissu musculaire. *CAMK* Ca^{2+} : calmodulin-dependent protein kinase, *p38* : p38 MAPK, *AMPK* : AMP protein kinase, *Sirt1* : sirtuin 1, *CREB* : cAMP response element binding, *MEF2* : myocyte enhancing factor 2, *P* : phosphorylation, *Ac* : acétylation. Schéma inspiré de la revue de questions de Olesen et al. (2010)

2. Modifications post-traductionnelles de PGC-1 α

L'activité de PGC-1 α est bien sûr corrélée à son niveau d'expression cellulaire. Mais les modifications post-traductionnelles occupent également une place prépondérante dans la régulation de cette activité. Ainsi, l'activité de PGC-1 α est également modulée selon son degré de phosphorylation (Jager et al. 2007) ou de désacétylation (Jeninga et al. 2010). Ainsi, des études *in vitro* ont prouvé que la p38 MAPK induisait une phosphorylation de PGC-1 α au niveau de 3 résidus (sérine et thréonine) contribuant à rendre la protéine plus active et plus stable (Puigserver et al. 2001) (Figure 6). L'AMPK phosphoryle également PGC-1 α au niveau de 2 résidus thréonine et sérine ce qui participe à augmenter son activité (Jager et al. 2007) (Figure 6). SIRT1 est une désacétylase dépendante du NAD⁺ exerçant son activité enzymatique sur les histones mais également sur des régulateurs transcriptionnels comme PGC-1 α , modulant par ce biais son activité. Ainsi, SIRT1 désacétylase PGC-1 α et le maintient ainsi dans sa forme active capable de se fixer à la chromatine (Gerhart-Hines et al. 2007). De récents travaux en culture cellulaire ont démontré que l'AMPK en augmentant le contenu cellulaire en NAD⁺ permettait d'activer SIRT1, et donc de désacétyler PGC-1 α (Canto et al. 2009). Ces résultats suggèrent que l'AMPK, SIRT1 et PGC-1 α permettent ensemble une régulation métabolique de la cellule musculaire, tout particulièrement dans le cadre de l'exercice physique (Figure 6).

C. Rôle des ERDO dans l'activation de PGC-1 α

PGC-1 α apparaît être un facteur de transcription redox sensible dans la mesure où il a été montré que son expression augmentait au sein de myotubes exposés au H₂O₂, mais qu'un prétraitement avec un antioxydant (N-acétylcystéine) inhibait cette augmentation (Irrcher et al. 2009). En observant que le peroxyde d'hydrogène réduisait également le contenu cellulaire en ATP et activait l'AMPK, Irrcher et al. (2009) ont suggéré que les ERDO n'induisaient pas directement la transcription de PGC-1 α , mais via l'activation de l'AMPK. D'un autre côté, Kang et al. (2009) ont récemment observé dans le muscle de rongeurs que l'administration d'allopurinol (un inhibiteur de la XO) préalablement à un exercice exhaustif prévenait l'augmentation de l'expression de PGC-1 α mais également l'activation de la p38 MAPK. Ces travaux suggèrent donc que les ERDO pourraient également réguler l'expression de PGC-1 α via la p38 MAPK. Par ailleurs, l'analyse du promoteur humain de PGC-1 α a permis de révéler de nombreux sites de fixation pour un grand nombre de facteurs de transcription tels que SP1, CREB, ATF2, p53 ou encore MEF2 (Irrcher et al. 2008). La plupart de ces facteurs de transcription sont reconnus comme étant redox sensibles suggérant de nombreuses autres possibilités de régulation du gène de PGC-1 α par les ERDO. Néanmoins, davantage de travaux sont nécessaires pour véritablement démontrer ces hypothèses.

D. Rôles de PGC-1 α dans le tissu musculaire

Les premiers travaux menés sur PGC-1 α ont permis de découvrir de nombreuses fonctions pour ce co-activateur au sein d'un grand nombre de tissus comme le cœur, le foie, le cerveau, le tissu adipeux et évidemment le muscle squelettique (Lin et al. 2005). PGC-1 α fut dans un premier temps reconnu comme le régulateur central de la biogenèse mitochondriale (Puigserver and Spiegelman 2003), mais des récents travaux lui attribuent également des fonctions protectrices pour lutter contre l'atrophie musculaire (Sandri et al. 2006; Brault et al. 2010).

1. **Rôle dans la biogénèse mitochondriale**

La biogénèse mitochondriale implique une multitude de voies de signalisation moléculaire qui demandent encore à être complètement élucidées. PGC-1 α est néanmoins reconnu comme le régulateur central parmi l'ensemble des facteurs de transcription concernés par ce processus (Puigserver et al. 1998; Puigserver and Spiegelman 2003). Les travaux sur des modèles de souris knockout de PGC-1 α (KO PGC-1 α) ou transgéniques surexprimant ce gène spécifiquement au niveau musculaire (MCK PGC-1 α) ont permis d'établir le rôle clé de ce co-activateur dans la biogénèse mitochondriale. En effet, la délétion de PGC-1 α dans le muscle est clairement associée à une réduction du contenu mitochondrial et de l'activité d'enzymes essentielles au fonctionnement mitochondrial (e.g. CS, SDH ou COXI) (Adhihetty et al. 2009; Leick et al. 2010a; Leick et al. 2010c). Au contraire, la surexpression chronique de PGC-1 α dans le muscle conduit à une élévation de ces mêmes marqueurs mitochondriaux (Wenz et al. 2009; Brault et al. 2010).

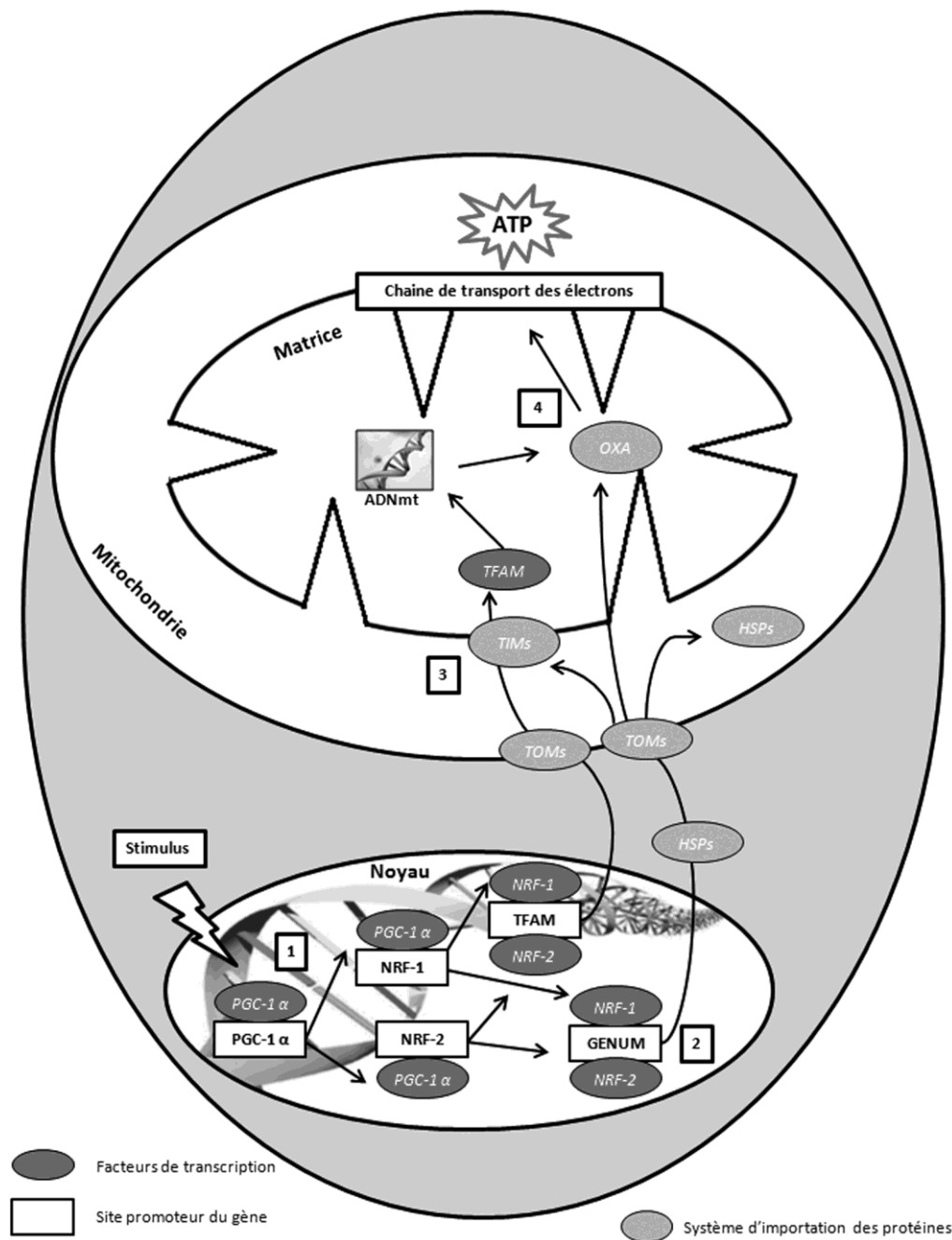
PGC-1 α ne régule pas directement l'expression des gènes nucléaires encodant les protéines mitochondriales, mais agit sur d'autres facteurs de transcription qui serviront d'intermédiaires dans cette régulation (Puigserver et al. 1999). Il est reconnu que la majorité des gènes encodant les composants de l'ETC, de la réplication de l'ADNmt et du système d'importation des protéines possèdent des sites spécifiques pour un certain nombre de facteurs de transcription nucléaires (SP1, CREB, cAMP, NRF-1 et 2) (Hood et al. 2006). Parmi ceux-ci, les Nuclear respiratory factors 1 et 2 (NRF-1, NRF-2) sont deux cibles reconnues du PGC-1 α , dont l'activation induit une augmentation de l'expression des gènes nucléaires encodant les protéines mitochondriales (Encadré 9). Par exemple, il a été démontré que le gène du cytochrome c, marqueur représentatif du contenu mitochondrial dans le tissu musculaire, possédait un site de fixation sur l'ADN spécifique pour NRF-1 (Evans and Scarpulla 1989). Les NRF-1 et 2 régulent également l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la réplication de l'ADN mitochondrial en se fixant sur les séquences promotrices des gènes encodés spécifiquement par l'ADNmt (Virbasius and Scarpulla 1994). L'un des plus importants de ces gènes est le mitochondrial transcription factor A (TFAM). Ce facteur de

transcription régule la réplication et la transcription du génome mitochondrial en se fixant sur la région boucle-D de l'ADNmt (Virbasius and Scarpulla 1994). Ainsi, la quantité d'ADNmt varie directement en fonction du contenu en TFAM dans la cellule (Kang et al. 2007). Il a été établi que le gène de TFAM possédait des sites consensus de fixation à la fois pour le NRF-1 et le NRF-2. Cette caractéristique constitue un mécanisme cellulaire essentiel permettant d'adapter l'expression des protéines mitochondriales issues de l'ADN nucléaire avec l'expression des protéines mitochondriales issues de l'ADNmt (Virbasius and Scarpulla 1994) (Encadré 9).

2. Rôle dans l'apoptose

Des travaux récents ont montré que PGC-1 α pouvait participer à la régulation des processus apoptotiques au sein du tissu musculaire. Ainsi, Aldiheyty et al. (2009) ont observé que les mitochondries musculaires exposées au ROS libéraient une quantité supérieure de cytochrome c chez des souris KO de PGC-1 α comparées à leurs homologues wild-type. Par ailleurs, la surexpression chronique de PGC-1 α au sein du tissu musculaire (souris MCK PGC-1 α) permet de prévenir efficacement la fragmentation de l'ADN associée à l'âge (Wenz et al. 2009). Cet effet anti-apoptotique pourrait s'expliquer en partie par le maintien du ratio Bcl-2/Bax durant le processus de vieillissement chez les souris MCK PGC-1 α (Wenz et al. 2009). Même si davantage de travaux apparaissent encore nécessaires, ces récentes études laissent penser qu'augmenter l'expression musculaire de PGC-1 α via l'exercice physique ou par traitement pharmacologique permettrait de limiter l'aggravation du phénomène d'apoptose associé au vieillissement.

Encadré 9. Régulation de la biogénèse mitochondriale par PGC-1 α



Dans la cellule musculaire, différents molécules, stimulées principalement lors de la contraction musculaire, vont activer le processus de biogénèse mitochondriale. Ces molécules vont augmenter l'activité du facteur de transcription PGC-1 α conduisant à stimuler sa propre expression et l'expression des gènes NRF-1 et NRF-2 (1). Ces derniers vont alors stimuler l'expression des gènes nucléaires encodant les protéines mitochondriales (GENUM) (2). NRF-1 et NRF-2 augmentent l'expression du TFAM, qui via les différents complexes du système d'importation des protéines mitochondriales (HSPs, TOMs, TIMs), va être transporté dans la matrice mitochondriale et stimuler l'expression des 13 gènes encodés par l'ADN mitochondrial (3). Les protéines encodées par les génomes nucléaire et mitochondrial vont être ensuite assemblées via des complexes spécifiques (OXA) pour former les différents complexes de la chaîne de transport des électrons nécessaires pour la synthèse de l'ATP (4).

3. Rôle dans la dégradation protéique

PGC-1 α joue également un rôle essentiel dans la dégradation protéique au sein du tissu musculaire en limitant l'activité des ubiquitine ligases (e.g MAFbx et MuRF-1) impliquées dans le système protéolytique ubiquitine protéasome. En effet, Sandri et al. (2006) ont montré que des souris MCK PGC-1 α présentaient une augmentation plus faible de l'expression de MAFbx et MuRF-1 dans le muscle squelettique suite à une dénervation. Dans le même temps, l'atrophie musculaire due à la dénervation était significativement plus faible chez les souris MCK PGC-1 α comparées à leurs homologues wild-type. En surexprimant artificiellement PGC-1 α de manière différente (via électroporation musculaire de plasmides codant pour PGC-1 α), Brault et al. (2010) ont également observé que PGC-1 α limitait l'atrophie musculaire et l'augmentation de l'expression de MAFbx et MuRF-1 suite à une dénervation. Cet effet inhibiteur de PGC-1 α sur la dégradation protéique pourrait être arbitré par le facteur de transcription FoxO3. Ce dernier est en effet reconnu comme d'un des régulateurs essentiels de la protéolyse en agissant directement sur certaines ubiquitine ligases comme MAFbx (Sandri et al. 2004). Ainsi, il a été observé que les activités promotrices des gènes MAFbx et MuRF-1 et l'activité protéolytique étaient limitées par PGC-1 α dans des myotubes surexprimant de manière constitutive une forme active FoxO3 (Brault et al. 2010). Le même constat avait déjà été observé *ex vivo* au sein d'un muscle squelettique dans lequel avait été effectué une électroporation de plasmides codant pour FoxO3 et PGC-1 α (Sandri et al. 2006). L'exercice physique ou des traitements pharmacologiques, reconnus pour surexprimer PGC-1 α dans le tissu musculaire, pourraient donc constituer des stratégies thérapeutiques efficaces contre la sarcopénie en limitant notamment la dégradation protéique (Figure 7).

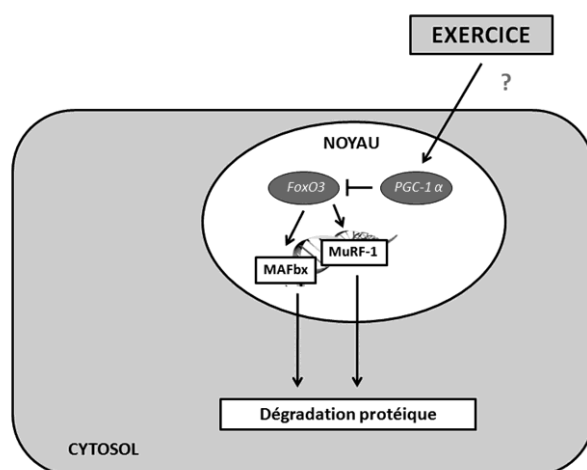


Figure 7. Rôle protecteur de l'exercice suggéré pour limiter la dégradation protéique via la stimulation de PGC-1 α . En augmentant l'expression de PGC-1 α au sein du tissu musculaire, l'exercice pourrait permettre de limiter l'activation de la dégradation protéique dans diverses conditions telles que le vieillissement ou l'inactivité prolongée.

E. Pour résumer...

Une grande attention est portée au co-activateur transcriptionnel peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1 α depuis sa découverte en 1998 par l'équipe du professeur Spiegelman (Puigserver et al. 1998). **PGC-1 α fut dans un premier temps reconnu comme le régulateur central de la biogenèse mitochondriale (Puigserver and Spiegelman 2003), mais des travaux récents lui attribuent également des fonctions protectrices pour lutter contre l'atrophie musculaire.** Il semblerait que PGC-1 α exerce des actions anti-apoptotiques et inhibitrices de la dégradation protéique au sein du tissu musculaire (Sandri et al. 2006; Brault et al. 2010). L'exercice physique est reconnu comme le principal responsable de l'augmentation de l'activité de PGC-1 α au sein du tissu musculaire que ce soit chez l'homme ou le rongeur (Baar et al. 2002; Wright et al. 2007b; Little et al. 2011; Safdar et al. 2011). Cette augmentation de l'activité de PGC-1 α au sein du tissu musculaire se fait via une augmentation de son expression mais également par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation et acétylation). Ainsi, l'augmentation de son expression impliquerait plusieurs intermédiaires intracellulaires comme l'AMPK, la p38 MAPK, la calcineurine, la CaMK ou encore les ERDO. SIRT1 et la p38 MAPK pourraient aussi jouer un rôle essentiel dans les modifications post-traductionnelles. **Au regard de ses fonctions protectrices, il apparaît essentiel de maintenir au long de la vie l'activité de PGC-1 α dans le tissu musculaire. Dans ce contexte, l'exercice physique constituerait indéniablement le moyen physiologique le plus efficace pour atteindre cet objectif.**

3. Implications de la p38 MAPK dans la sarcopénie

A. Généralités sur la p38 MAPK

Les MAP kinases sont intégrées dans des voies de signalisation régulant un grand nombre de fonctions au sein des cellules eucaryotes. A l'heure actuelle, trois principales cascades des MAP kinases ont été caractérisées : les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERKs), les kinases N-terminales-c-Jun (JNKs) et les p38 MAP kinases (Sumbayev and Yasinska 2005). Toutes ces sous-catégories de MAP kinases sont composées de 3 kinases s'activant successivement : les MAP kinases, les kinases MAP kinases (MKK) et les kinases de MKK (MKKK). MKKK conduit à la phosphorylation et donc à l'activation de MKK, qui elle-même induira la phosphorylation d'un site spécifique de la MAP kinase et donc à son activation. Leurs substrats situés dans le cytosol ou le noyau comprennent d'autres kinases, des facteurs de transcription, des phospholipases ou des protéines cytosquelettiques (Widmann et al. 1999; Roux and Blenis 2004). Parmi les 3 familles de MAP kinases évoquées, la p38 MAPK pourrait jouer un rôle essentiel dans la sarcopénie car elle est reconnue comme impliquée dans la régulation de la myogenèse (Lluis et al. 2006), la dégradation protéique (Li et al. 2005), l'apoptose (Sumbayev and Yasinska 2005) ou encore la biogenèse mitochondriale (Pogozelski et al. 2009). Il existe 4 isoformes de p38 MAP kinases : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ dont les MKK6 et MKK3 phosphorylent certains de leurs résidus thréonine et/ou tyrosine pour les activer (Nebreda and Porras 2000; Kyriakis and Avruch 2001) (Figure 8). Lorsqu'elle est activée, la p38 MAPK phosphoryle elle-même les résidus sérine ou thréonine de ces substrats comprenant notamment la sous-unité p65 de NF- κ B (Kefaloyianni et al. 2006) et PGC-1 α (Puigserver et al. 2001).

B. Rôle des ERDO dans l'activation de la p38 MAPK

Les recherches focalisées sur le tissu musculaire ont permis d'établir que les ERDO activaient la p38 MAPK aussi bien *in vitro* en incubant des cellules musculaires en présence d'H₂O₂ (Ho et al. 2005; Hsieh and Papaconstantinou 2006; Kefaloyianni et al. 2006; McClung et al. 2010) que *in vivo* en réponse à l'exercice physique (Gomez-Cabrera et al. 2005; Kang et al. 2009). L'implication directe des ERDO dans l'activation de la p38 MAPK en réponse à l'exercice a été mise en évidence via l'utilisation de l'allopurinol, un inhibiteur de la XO. Ainsi, cette molécule antioxydante administrée avant l'exercice prévient totalement la phosphorylation de la p38 MAPK constatée à la fin de l'exercice dans le tissu musculaire de rongeurs (Gomez-Cabrera et al. 2005; Kang et al. 2009) démontrant ainsi l'implication des ERDO dans l'activation de la p38 MAPK à l'exercice. L'âge comme l'inactivité physique sont associés à une surproduction d'ERDO au sein du tissu musculaire

(Production d'ERDO, page 44). Au regard de l'implication des ERDO dans la régulation de la p38 MAPK, il est probable que cette surproduction soit impliquée dans l'hyperphosphorylation chronique de la p38 MAPK observée dans le tissu musculaire âgé (Williamson et al. 2003; Wu et al. 2009).

Même si l'activation de la p38 MAPK par les ERDO a été grandement étudiée, les voies de signalisation impliquées dans cette régulation demeurent encore mal établies. Il semblerait néanmoins que la thiorédoxine et la protéine ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) jouent un rôle essentiel dans l'activation de la p38 MAPK (Matsukawa et al. 2004; Choi et al. 2011). En effet, la thiorédoxine et la protéine ASK1 forment en condition basale un hétérodimère qui sous l'action des ERDO va se dissocier permettant la libération et l'activation d'ASK1 (Saitoh et al. 1998; Hsieh and Papaconstantinou 2006). La forme activée d'ASK1 peut alors phosphoryler les MKK3 et MKK6 conduisant à la phosphorylation, et donc l'activation de la p38 MAPK (Ichijo et al. 1997) (Figure 8). Certaines phosphatases sensibles aux ERDO comme la MAPK-phosphatase 1 (MKP-1) pourraient jouer un rôle non négligeable dans la régulation de l'activité de la p38 MAPK. En effet, MKP-1 est inductible sous l'effet du stress oxydant et induit une déphosphorylation des résidus thréonine et tyrosine responsable de l'activation de la p38 MAPK. Ainsi, MKP-1 permettrait de contrôler la phosphorylation de p38 MAPK induite par une surproduction d'ERDO dans le tissu musculaire (Flach and Bennett 2010) (Figure 8).

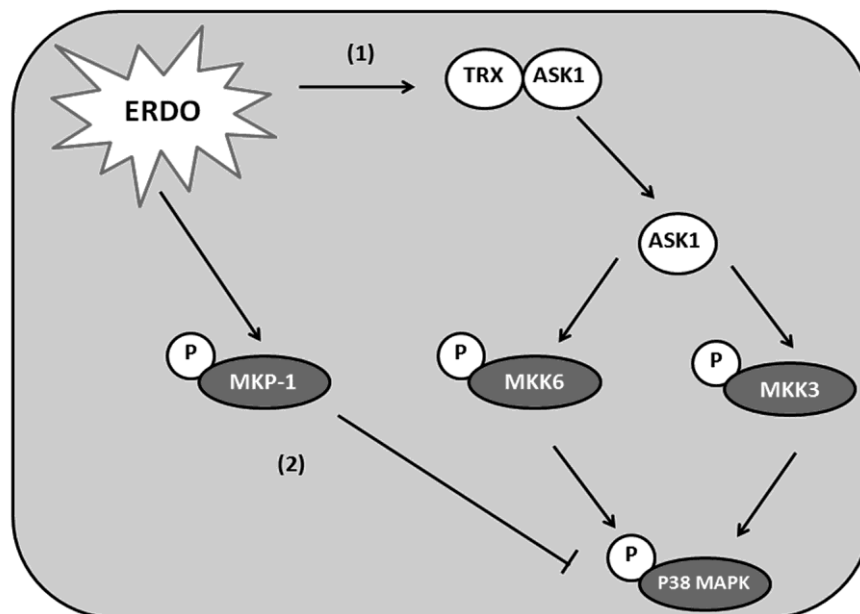


Figure 8. Schéma d'activation de la p38 MAPK par les ERDO. Les ERDO induisent l'oxydation de l'hétérodimère TrX-ASK1 conduisant à la libération d'ASK1. Ce dernier peut alors phosphoryler les MKK3 et MKK6 conduisant à la phosphorylation, et donc l'activation de la p38 MAPK (1). Un rétrocontrôle est cependant exercé par MKP-1 qui va être activé sous l'action des ERDO et induire la déphosphorylation de la p38 MAPK (2). *Trx* : Thiorédoxine, *ASK1* : apoptosis signal-regulating kinase 1, *MKK* : MAPK kinases, *MKP-1* : MAPK-phosphatase 1.

C. Rôle de la p38 MAPK dans le tissu musculaire

La p38 MAPK pourrait jouer un rôle essentiel dans la sarcopénie car elle est reconnue comme impliquée dans la régulation de la myogenèse (Lluis et al. 2006), la dégradation protéique (Li et al. 2005), l'apoptose (Sumbayev and Yasinska 2005) ou encore la biogenèse mitochondriale (Pogozelski et al. 2009). Elle n'agit néanmoins qu'indirectement sur toutes ces processus et constitue davantage un carrefour métabolique régulant l'activité de facteurs de transcription essentiels dans tous ces processus tels que PGC-1 α et NF- κ B.

1. Rôle dans la biogénèse mitochondriale

La p38 MAPK est impliquée dans la régulation de l'activité de PGC-1 α et apparaît pour cette raison jouer un rôle clé dans la biogenèse mitochondriale (Expression de PGC-1 α , page 65). Très récemment, les travaux de Pogozelski et al. (2009) ont permis de mettre en évidence que la p38 MAPK γ était la seule des 4 isoformes à être réellement impliquée dans la biogénèse mitochondriale. Ces derniers ont montré que parmi un ensemble de souris KO p38 γ , p38 α et p38 β muscle spécifiques (MKO), seules les souris MKO p38 γ ne présentaient aucune signe de stimulation de la biogenèse mitochondriale en réponse à 4 semaines d'entraînement en endurance. En effet, ni l'expression protéique de PGC-1 α , de COXIV et cytochrome c n'étaient modifiées au sein du tissu musculaire des MKO p38 γ . De plus, cette même équipe a observé que l'ARNm de PGC-1 α ne changeait pas chez des MKO p38 γ en réponse à une stimulation électrique de 2h du muscle contrairement aux souris wild type où une nette augmentation était constatée (Pogozelski et al. 2009).

2. Rôle dans la dégradation protéique

La p38 MAPK semble clairement jouer un rôle dans le système ubiquitine-protéasome au sein du tissu musculaire. Il a été montré que des myotubes stimulés par TNF- α ou H₂O₂ présentaient des niveaux de protéines polyubiquitinées et une réduction de leur diamètre plus faible en présence d'inhibiteurs de la p38 MAPK (i.e. SB203580) (Li et al. 2005). Cet effet préventif pourrait s'expliquer par l'implication de la p38 MAPK dans l'élévation de l'expression des ubiquitine ligases MuRF-1 et MAFBx (Li et al. 2005; McClung et al. 2010). Le facteur de transcription NF- κ B est également reconnu comme stimulant l'expression des ubiquitine ligases MuRF-1 et MAFBx (Rôle dans la dégradation protéique, page 62), et pourrait donc constituer un intermédiaire entre l'activation de la p38 MAPK et l'augmentation de l'expression des ubiquitine ligases. En effet, plusieurs travaux ont démontré que la p38 MAPK induisait la phosphorylation des isoformes d'IKK (Ho et al. 2005) et de la sous-unité p65 de NF- κ B (Kefaloyianni et al. 2006), ces mécanismes contribuant à stimuler l'activité de NF- κ B.

3. Rôle dans la régénération musculaire

L'activation des cellules satellites est caractérisée par l'expression de facteurs de régulation myogénique Myf5 et MyoD. Une fois la phase de prolifération terminée, les cellules satellites expriment la myogénine et MRF4 permettant d'induire la différenciation myogénique (Encadré 2, page 25). Ce processus de différenciation est possible grâce à l'élévation préalable de l'expression de la p21, un inhibiteur de la prolifération cellulaire, permettant ainsi aux myoblastes de sortir du cycle cellulaire et se différencier (Charge and Rudnicki 2004). Le processus de régénération musculaire s'effectue via un système complexe de signaux intrinsèques et extrinsèques aux cellules satellites. Les nombreux travaux, menés essentiellement sur des modèles *in vitro*, ont permis de mieux comprendre ces mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui régulent la régénération musculaire. L'initiation du programme myogénique dans le tissu musculaire adulte est une étape clé dans le processus de régénération musculaire, et nécessite un remodelage de la chromatine dans les cellules satellites quiescentes afin de permettre l'activation transcriptionnelle des facteurs de régulation myogénique (Charge and Rudnicki 2004). La phosphorylation de la p38 MAPK favorise le remodelage de la chromatine en activant la sous-unité BAF60a ce qui permet au complexe SWI/SNF de remodelage de se fixer à la chromatine (Simone et al. 2004). Ce mécanisme permet ainsi à MyoD et MEF2 de se fixer sur leur site promoteur et activer un certain nombre de gènes impliqués dans la différenciation myoblastique dont la myogénine (Simone et al. 2004; de la Serna et al. 2005; Lluís et al. 2005). Par ailleurs, MyoD nécessite de former un hétérodimère avec la protéine E47 pour pouvoir se fixer sur les sites promoteurs de ses gènes cibles (Lluís et al. 2005). La phosphorylation de E47 par la P38 MAPK semble favoriser ce processus en conduisant à la formation de cet hétérodimère MyoD-E47 (Puri et al. 2000; Lluís et al. 2005). Il est par ailleurs important de souligner que la p38 MAPK favorise la sortie du cycle cellulaire en stimulant l'expression de p21 afin que la différenciation terminale puisse se produire (Wu et al. 2000; Cabane et al. 2003). L'ensemble de ces travaux *in vitro* démontrent une implication de la p38 MAPK dans le processus de régénération musculaire, et plus particulièrement dans la différenciation terminale (Puri et al. 2000; Wu et al. 2000; Cabane et al. 2003). Ils suggèrent que la p38 MAPK pourrait être impliquée dans les dysfonctions de la régénération musculaire observée dans le muscle âgé.

D. Pour résumer

Les MAP kinases sont intégrées dans des voies de signalisation régulant un grand nombre de fonctions au sein des cellules eucaryotes. A l'heure actuelle, trois principales cascades des MAP kinases ont été caractérisées : **les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERKs), les kinases N-terminales-c-Jun (JNKs) et les p38 MAP kinases** (Sumbayev and Yasinska 2005). Toutes ces sous-catégories de MAP kinases sont composées de 3 kinases s'activant successivement : les MAP kinases, les kinases MAP kinases (MKK) et les kinases de MKK (MKKK). MKKK conduit à la phosphorylation et donc à l'activation de MKK, qui elle-même induira la phosphorylation d'un site spécifique de la MAP kinase et donc à son activation. Les recherches focalisées sur le tissu musculaire ont permis d'établir que **les ERDO activaient la p38 MAPK** aussi bien en culture cellulaire (Ho et al. 2005; Hsieh and Papaconstantinou 2006; Kefaloyianni et al. 2006; McClung et al. 2010) que *in vivo* en réponse à l'exercice physique (Gomez-Cabrera et al. 2005; Kang et al. 2009). L'âge comme l'inactivité physique sont associés à une surproduction chronique d'ERDO au sein du tissu musculaire (Production d'ERDO, page 44). **Au regard de l'implication des ERDO dans la régulation de la p38 MAPK, il est probable que cette surproduction soit impliquée dans l'hyperphosphorylation chronique de la p38 MAPK observée dans le tissu musculaire âgé** (Williamson et al. 2003; Wu et al. 2009). Cette hyperphosphorylation pourrait jouer un rôle essentiel dans la sarcopénie dans la mesure où la p38 MAPK est impliquée à la fois dans la régulation de la myogenèse (Lluis et al. 2006), de la dégradation protéique (Li et al. 2005), de l'apoptose (Sumbayev and Yasinska 2005) ou encore de la biogenèse mitochondriale (Pogozelski et al. 2009).

SYNTHESE ET OBJECTIFS

La définition du concept de sarcopénie constitue un débat d'actualité à la fois dans le monde scientifique et dans le domaine médical. Même si aucun consensus n'est encore clairement établi, on peut néanmoins considérer que la sarcopénie est un syndrome gériatrique se caractérisant dans un premier temps par une diminution de la masse musculaire qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques (Cruz-Jentoft et al. 2010). La sarcopénie observée chez la personne âgée est évidemment imputable au processus de vieillissement, mais son apparition et son développement peuvent être accélérés sous l'effet de facteurs pathologiques et comportementaux (Buford et al. 2010a). Depuis un siècle à peine (un espace de temps infime dans l'échelle de l'évolution), le comportement de l'homme moderne, en matière d'activité physique, a radicalement changé. Ce dernier adopte en effet un mode de vie de plus en plus inactif. Cette inactivité chronique est apparue trop soudainement pour permettre à notre génotype de s'adapter, et favorise ainsi la prévalence d'un grand nombre de maladies chroniques. Mais indépendamment des maladies chroniques mentionnées précédemment, de plus en plus de preuves s'accumulent pour montrer que l'inactivité physique contribue également à accélérer l'apparition et le développement de la sarcopénie (Buford et al. 2010a).

La diminution de la force musculaire constatée dans la sarcopénie est essentiellement due à l'atrophie musculaire, même si une diminution de la force spécifique (i.e. la force générée rapportée à la surface de la fibre) est également impliquée. L'atrophie musculaire s'explique en partie par la réduction de la synthèse protéique musculaire et l'augmentation de la dégradation protéique via l'activation du système ubiquitine-protéasome. L'apoptose des noyaux musculaires en réduisant le domaine nucléaire des fibres musculaires apparaît également un mécanisme essentiel dans l'atrophie du muscle âgé. Ce phénomène est probablement aggravé par les altérations des capacités de régénération musculaire limitant l'incorporation de nouveaux noyaux au sein des fibres musculaires vieillissantes. La réduction du pool de cellules satellites et de leurs capacités de prolifération et de différenciation (en raison notamment d'un environnement cellulaire et systémique moins fonctionnel) apparaissent être responsables des altérations de la régénération musculaire. Même si les mécanismes responsables de l'atrophie musculaire ne sont pas exactement identiques, de grandes similitudes existent entre les effets de l'âge et de l'inactivité suggérant que cette dernière pourrait favoriser le développement de la sarcopénie des populations âgées. Ces mécanismes font intervenir des facteurs cellulaires et systémiques comme les dysfonctions mitochondriales, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la production d'hormones anabolisantes (GH, IGF-1, testostérone, insuline). Les liens et interactions entre ces multiples facteurs restent encore mal connus. Un candidat potentiel pourrait être le stress oxydant chronique. Les travaux récents soulignent l'implication de celui-ci dans la sarcopénie.

L'âge tout comme l'inactivité radicale sont associés à une augmentation de la production d'ERDO au sein du tissu musculaire (Bejma and Ji 1999; Capel et al. 2005; Vasilaki et al. 2006a; Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). Certains travaux ont montré que les dysfonctions mitochondriales pouvaient jouer un rôle essentiel dans cette surproduction musculaire d'ERDO (Capel et al. 2004; Kavazis et al. 2009; Xu et al. 2010). Si certains travaux ont également observé une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase dans le muscle âgé ou inactif (Lambertucci et al. 2007; Hofer et al. 2008), il n'est néanmoins toujours pas établi si cette source cellulaire d'ERDO joue un rôle majeur ou non dans la surproduction d'ERDO musculaire et quel est son impact dans le développement de la sarcopénie. En dépit des adaptations des systèmes de défense antioxydants chez un individu souffrant de sarcopénie (Pansarasa et al. 1999; Hollander et al. 2000; Servais et al. 2007), la surproduction d'ERDO associée à l'âge et/ou à l'inactivité devient trop importante et est à l'origine d'un stress oxydant chronique. Les travaux menés en culture cellulaire ont montré que le stress oxydant stimulait plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans l'atrophie musculaire comme la protéolyse ou les altérations du fonctionnement des cellules satellites. Pour ces raisons, le stress oxydant chronique observé dans le muscle âgé et/ou inactif pourrait promouvoir ces mécanismes et donc favoriser le développement de la sarcopénie. Néanmoins, le lien entre ces mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie et le stress oxydant demandent à être clairement démontrés *in vivo* au sein du tissu musculaire âgé et/ou inactif. Ce lien pourrait être en partie assuré par un certain nombre de voies de signalisation intracellulaire impliquant des kinases, phosphatases ou facteurs de transcription redox sensibles comme notamment NF- κ B, la p38 MAPK ou PGC-1 α .

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse est donc de déterminer *in vivo* dans quelles mesures un stress oxydant chronique au sein du tissu musculaire (que celui-ci soit lié à l'avance en âge et/ou à l'inactivité) peut moduler certaines voies de signalisation impliquées dans les mécanismes cellulaires à l'origine de la sarcopénie.

Les objectifs spécifiques de cette thèse sont les suivants :

- **Déterminer si inhiber l'activité de la xanthine oxydase permet de prévenir efficacement l'atrophie musculaire induite par l'inactivité physique chez le rongeur.** Nous faisons l'hypothèse que la XO constitue une source majeure d'ERDO responsable du stress oxydant chronique induit par l'inactivité physique. La réduction de l'activité de la XO pourrait donc permettre de limiter la protéolyse musculaire en modulant les voies de signalisation impliquant NF- κ B et la p38 MAPK (Etude 1).

- **Déterminer si le stress oxydant chronique dans le tissu musculaire âgé de rongeurs peut moduler certaines voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'activité des cellules satellites.** Nous faisons l'hypothèse que la p38 MAPK pourrait d'ailleurs jouer un rôle clé dans ces processus (Etude 2).
- **Déterminer si l'entraînement de rongeurs âgés inactifs depuis leur plus jeune âge permettrait de stimuler physiologiquement au sein du tissu musculaire l'expression de PGC-1 α ,** un facteur de transcription dont la surexpression est reconnue pour limiter l'atrophie musculaire.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

Chapitre 1 : Travaux expérimentaux

Etude n°1 : La réduction du stress oxydant induite par la xanthine oxydase limite l'atrophie musculaire et l'activation de NF-κB chez le rat immobilisé

RESUME FRANCAIS

INTRODUCTION

De nombreuses maladies chroniques ainsi que certaines conditions environnementales, comme l'inactivité physique, peuvent induire une atrophie et des dysfonctions du tissu musculaire. Ce phénomène augmente la morbi-mortalité, entrave l'autonomie et augmente les coûts de santé (Lynch 2001).

L'atrophie musculaire liée à l'inactivité sous ses différentes formes (i.e. alitement, plâtrage, suspension par la queue chez le rongeur) est associée à une surproduction d'espèces principalement dérivées de l'oxygène (ERDO) (Matuszczak et al. 2004; Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). Dans le tissu musculaire, un certain nombre de sources de production d'ERDO comme la NAD(P)H oxydase, l'oxyde nitrique synthétase (NOS), la mitochondrie ou encore la xanthine oxydase (XO). Cependant, l'implication de ces différentes sources dans le cadre de l'inactivité demeure un objet de débat. Un certain nombre de travaux ont montré que la XO jouait un rôle important dans cette surproduction (Kondo et al. 1993c; Matuszczak et al. 2004; Hofer et al. 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels cette enzyme favorise les dysfonctions musculaires demeurent inconnus.

L'allopurinol est un inhibiteur reconnu de la XO (Moorhouse et al. 1987). Des travaux antérieurs de l'équipe du Pr Viña ont montré qu'il prévient les dommages oxydatifs musculaires liés à un exercice physique exhaustif en inhibant les voies de signalisation intracellulaire impliquant les MAP kinases et NF-κB (Gomez-Cabrera et al. 2005; Gomez-Cabrera et al. 2006). La p38 MAPK et NF-κB sont connus pour réguler d'importantes voies de signalisation redox-sensibles. Les travaux de ... indiquent qu'ils sont activés dans le muscle inactif, mais le lien avec le stress oxydant n'a jamais été démontré. Nous suggérons donc que la surproduction musculaire chronique d'ERDO induite par l'inactivité jouerait un rôle clé dans leurs activations.

Au niveau cellulaire, la perturbation du turnover protéique est un des principaux facteurs responsables de l'atrophie et les dysfonctions musculaires associées à l'inactivité (Yimlamai et al. 2005; Vazeille et al. 2008). Deux ubiquitine ligases E3 spécifiques au muscle, le Muscle atrophy F-Box (MAFbx; aussi appelé atrogin-1) et le Muscle RING (really interesting new gene) Finger-1 (MuRF-1), suscitent actuellement un intérêt thérapeutique majeur dans l'optique d'identifier de nouvelles molécules cibles. MAFbx et MuRF-1 appartiennent au système ubiquitine protéasome, le système primaire impliqué dans la dégradation des protéines intracellulaires au sein du tissu

musculaire (Lecker et al. 1999). Des études récentes suggèrent que la p38 MAPK comme NF- κ B favoriseraient l'atrophie musculaire en stimulant l'expression de MAFbx et MuRF-1 (Cai et al. 2004; Li et al. 2008).

Dans ce contexte, les objectifs de cette étude sont: 1) Déterminer le rôle de la XO dans le stress oxydant et l'atrophie musculaire liés à l'inactivité, 2) Préciser si le stress oxydant ainsi induit contribue à stimuler les voies de signalisation impliquant NF- κ B, la p38 MAPK et les ubiquitine ligases MAFbx et MuRF-1.

MATERIEL ET METHODES

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé un modèle de suspension par la queue qui est le plus fréquemment utilisé pour induire une inactivité musculaire des membres inférieurs chez le rongeur (Morey-Holton and Globus 2002). Pour étudier l'implication de la XO dans le stress oxydant associé à l'inactivité, nous avons supplémenté une partie des animaux suspendus avec de l'allopurinol dans l'eau de boisson (50 mg/kg/jour). Ainsi, 32 rats Wistar mâles ont été répartis en 4 groupes expérimentaux : contrôles avec eau (n=9), contrôles supplémentés en allopurinol (n=9), suspendus par la queue avec de l'eau (n=7), suspendus par la queue supplémentés en allopurinol (n=7). Après 14 jours de suspension, les rats sont sacrifiés et le sang veineux est prélevé au niveau de la veine cave puis centrifugé afin d'en extraire le plasma. Dans le même temps, les muscles soléaires sont prélevés, pesés puis congelés dans l'attente des analyses. L'ensemble des détails du protocole expérimental ainsi que les analyses effectuées dans le cadre de cette étude figurent dans la partie Annexes (i.e. Fiches techniques n°7, 8, 14-29, 31).

RESULTATS

L'atrophie du muscle soléaire induite par 14 jours de suspension par la queue est significativement réduite chez les animaux supplémentés en allopurinol (de -49% à -30%, $p < 0.01$). Le stress oxydant est objectivé à la fois dans le plasma et dans le muscle. Les activités plasmatique et musculaire de la XO augmentent tout comme plusieurs autres marqueurs du stress oxydant au sein du tissu musculaire (protéines carbonylées, contenu protéique des enzymes antioxydantes CuZnSOD et catalase). Au sein du muscle soléaire, ces phénomènes sont associés à une activation de la voie de signalisation impliquant NF- κ B. Celle-ci se traduit par une augmentation de la phosphorylation de IKK α , de la p38MAPK et de la sous-unité p65 de NF- κ B ainsi qu'à une augmentation de la fixation du complexe NF- κ B à l'ADN. Il est également noté une phosphorylation et une diminution du contenu cytosolique de I κ B α attestant d'une activation de la voie de signalisation classique de NF- κ B. Par ailleurs, l'immobilisation est également associée à une augmentation significative de l'expression des

niveaux d'ARNm des ubiquitine-ligases MAFbx et MuRF1, connues pour être up-régulées respectivement par la p38 MAPK et NF- κ B.

Chez les rats du groupe expérimental, l'allopurinol (un inhibiteur sélectif de la XO) réduit indiscutablement le stress oxydant plasmatique et musculaire et limite partiellement l'atrophie du muscle soléaire induite par l'immobilisation. Chez les rats immobilisés traités par l'allopurinol, l'atrophie du soléaire n'est plus que de 30%. L'allopurinol ne prévient pas l'activation de la voie de signalisation classique de NF- κ B comme en témoignent l'absence de modification de la phosphorylation et du contenu cytosolique de I κ B α , tout comme du contenu nucléaire de la sous-unité p65 de NF- κ B. Néanmoins, ce traitement à l'allopurinol limite efficacement la phosphorylation d'IKK α , de la p38 MAPK, de la sous-unité p65 de NF- κ B ainsi que l'élévation de l'activité de fixation du complexe NF- κ B à l'ADN. Parallèlement, l'allopurinol limite également l'augmentation de l'expression des niveaux d'ARNm des ubiquitine-ligases MAFbx et MuRF1 au sein du muscle soléaire.

CONCLUSION

Ces résultats :

1. confirment l'importance du stress oxydant dans l'atrophie musculaire induite par l'immobilisation. Ils soulignent le rôle de la XO dans l'induction du stress oxydant ainsi que son implication dans l'activation du complexe NF- κ B et des ubiquitine ligases MAFbx et MuRF1.
2. Objectivent un résultat original : au cours de l'immobilisation, la voie de signalisation impliquant NF- κ B est en partie activée par des mécanismes impliquant les ERDO, et ce indépendamment de I κ B α . Cette voie de signalisation impliquerait l'état de phosphorylation d'IKK α , de la p38 MAPK et de la sous-unité p65 de NF- κ B.

La figure 7 propose un modèle intégrant ces données en schématisant cette nouvelle voie de signalisation.

Title: Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents muscle atrophy and NF-κB activation during hindlimb unloading

Running title: Allopurinol prevent muscle atrophy during inactivity

Authors: Frederic Derbré^{1,2}, Beatriz Ferrando¹, Mari Carmen Gomez-Cabrera¹, Fabian Sanchis-Gomar¹, Vladimir E Martinez- Bello¹, Gloria Olaso-Gonzalez, Ana Diaz², Miguel Cerda³, Arlette Gratas-Delamarche¹, and Jose Viña.

Department of Physiology. University of Valencia. Fundacion Investigacion Hospital Clinico Universitario/INCLIVA. Spain.

¹ Laboratory “Movement Sport and Health Sciences”, University Rennes 2, Rennes, France

² UCIM. Faculty of Medicine. University of Valencia.

³ Department of Pathology, University of Valencia, Valencia

Correspondence:

Frédéric Derbré

Laboratory « Mouvement Sport Santé » (EA1274). University of Rennes 2, ENS Cachan.

UFR-APS. Avenue Charles Tillon CS 24414, 35044 Rennes Cedex, France.

Tel: 00 (33) (0) 2 99 14 17 75

Fax: 00 (33) (0) 2 99 14 17 74

Email: frederic.derbre@univ-rennes2.fr

Key Words: Inactivity, muscle atrophy, p38 MAPK, oxidative stress, allopurinol

**DECREASING XANTHINE OXIDASE-MEDIATED OXIDATIVE STRESS PREVENTS
MUSCLE ATROPHY AND NF-KB ACTIVATION DURING HINDLIMB UNLOADING**

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are generated during hindlimb unloading due, at least in part, to the activation of xanthine oxidase (XO). Administration of antioxidants protects skeletal muscle during unloading. However, the molecular mechanisms involved in this protection remain a topic of debate.

The major aim of this paper was to determine the mechanism by which ROS cause unloading-induced muscle atrophy and its possible prevention by allopurinol treatment. For this purpose we have studied two of the main redox sensitive signalling cascades involved in skeletal muscle atrophy i.e. NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the expression of two well known muscle specific E3 ubiquitin ligases involved in proteolysis, MAFbx and MuRF-1.

Our data suggest that XO-induced oxidative stress is involved in the activation of the p38 MAPK-MAFbx pathway in unloaded muscle atrophy. We have demonstrated that allopurinol treatment completely prevents the activation of XO but partially prevents the protein carbonylation and the loss of muscle mass (~19%) in soleus muscle during prolonged unloading. Our protocol is also associated with an activation of the NF- κ B (I κ B α , IKK α , p65) and p38 pathways that lead to an increase in the mRNA expression of the proteolytic E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and MAFbx in soleus muscle. Allopurinol treatment significantly prevented the activation of the p38 MAPK-MAFbx pathway but but also the NF- κ B-MuRF-1 one. Our results demonstrate that p38 MAPK promotes skeletal muscle atrophy during immobilization – first, by stimulating MAFbx expression, and second, by stimulating NF- κ B-MuRF-1 pathway through an I κ B α independant mechanism. Our data support the idea that XO is not the only source of ROS production in the skeletal muscle during hindlimb unloading, but point out the potential benefit of allopurinol administration for astronauts, bedridden and maybe sarcopenic individuals.

INTRODUCTION

Skeletal muscle atrophy is a debilitating consequence of multiple chronic diseases and conditions. It reduces treatment options and positive clinical outcomes as well as compromising quality of life and increasing morbidity and mortality (Lynch 2001).

Both systemic and local factors can initiate muscle atrophy. Systemic factors include increased myostatin and glucocorticoids; or a lack of anabolic hormones such as insulin or insulin-like growth factor-1 (Shavlakadze and Grounds 2006). Local factors include muscle inactivity, resulting from bed rest or limb immobilization for example; muscle denervation; or elevated calcium and ROS as commonly observed in muscular dystrophies and ageing (Powers et al. 2007).

Muscle atrophy and weakness are linked to oxidative stress in several conditions: limb immobilization (Kondo et al. 1993a), hindlimb-unloading (Matuszczak et al. 2004; Arbogast et al. 2007; Servais et al. 2007; Jackson et al. ; Xu et al. 2010), chronic obstructive pulmonary disease (Mador and Bozkanat 2001) and sepsis (Barreiro et al. 2005). Numerous cellular sites of ROS production exist in skeletal muscle, including NAD(P)H oxidase, nitric oxide synthase, heme oxygenase-1, mitochondria, and XO. The involvement of each of these oxidant sources in chronic ROS overproduction during muscular inactivity remains a topic of debate. Xanthine oxidoreductase (XOR) is an intracellular enzyme involved in purine catabolism. This enzyme catalyzes the reduction of hypoxanthine and xanthine to uric acid (Ibrahim and Stoward 1978). XOR exists in two interconvertible forms, xanthine dehydrogenase (XDH) and XO. In the oxidase form, molecular oxygen is used as the electron acceptor and hypoxanthine and xanthine are reduced to uric acid and superoxide. During activating conditions, XDH can be converted to XO via sulfhydryl oxidation or proteolytic cleavage. Several researchers have shown that XO plays an essential role in diseased cardiac muscle (McCord 1985) and is a source of oxidant production in immobilized rats (Kondo et al. 1993c), in hindlimb unloading (Matuszczak et al. 2004) and in mechanical ventilation-induced diaphragmatic contractile dysfunction (Whidden et al. 2009). However, the molecular mechanism(s) by which this enzyme elicits skeletal muscle dysfunction remains unknown.

Allopurinol is a well-known inhibitor of XOR, widely used in the clinical practice (Moorhouse et al. 1987). We have previously reported that allopurinol prevents muscle oxidative damage during exhaustive physical exercise by inhibiting the MAPK-NF- κ B cell signalling pathways (Gomez-Cabrera et al. 2005; Gomez-Cabrera et al. 2006). P38 MAPK and NF- κ B mediate very relevant oxidative stress-sensitive cell signalling pathways and it has been suggested that chronic ROS overproduction play a role in their activation during muscular inactivity (Li et al. 2005; Powers et al. 2010).

The loss in muscle mass during muscular inactivity is caused by both apoptosis of myonuclei (Oishi et al. 2008) and imbalance between protein synthesis and degradation (Vazelle et al. 2008). The discovery of two muscle-specific E3 ubiquitin ligases, Muscle atrophy F-Box (MAFbx; also known as atrogin-1) and Muscle RING (really interesting new gene) Finger-1 (MuRF-1), prompted renewed expectation in identifying muscle-specific targets for therapeutic manipulation. MAFbx and MuRF-1 belong to the ubiquitin proteasome pathway, the primary pathway involved in intracellular protein degradation in skeletal muscle (Lecker et al. 1999). MAFbx and MuRF-1 regulate the degradation of key proteins involved in striated muscle growth and differentiation, including MyoD, calcineurin, troponin-I, titin, myosin heavy and light chain (Kedar et al. 2004; Li et al. 2004).

Li et al. in 2008 suggested that the NF- κ B signalling pathway might contribute to muscle atrophy by stimulating proteolysis (Li et al. 2008). NF- κ B is indeed known to stimulate the expression of MuRF-1. MuRF-1 transcription, but not MAFbx, is increased by NF- κ B (Cai et al. 2004). Recent studies show that p38 activity in skeletal muscle is elevated by procatabolic states, which include limb immobilization (Childs et al. 2003), and that the MAPK stimulates the expression of MAFbx in skeletal muscle (Li et al. 2005)

Thus the major aim of this paper was to determine the mechanism(s) by which XO-derived ROS cause unloading-induced muscle atrophy and its possible prevention by allopurinol treatment.

We have found that in unloaded muscles, oxidative stress activates the p38 MAPK and the NF- κ B signalling pathway which lead to the activation of the E3 ubiquitin ligases MAFbx and MuRF-1. Both mechanism trigger massive degradation of muscle proteins that is partially prevented by allopurinol administration.

MATERIAL AND METHODS

Animal care and protocol

Thirty-two male Wistar rats, weighing ~300 g from Charles River, were housed in a temperature-controlled room ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) with a light dark cycle (12:12 h). After 1 week of acclimation, rats were assigned randomly to one of four experimental conditions: freely ambulating with water (CW) (n=9); freely ambulating treated with allopurinol (CA) (n=9); hindlimb unloaded with water (UW) (n=7); or hindlimb unloaded treated with allopurinol (UA) (n=7).

Allopurinol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) was administered in the animals via the drinking water. Allopurinol functions as a competitive inhibitor of ROS production by xanthine oxidase (Klein et al. 1996). An initial concentration of $25.6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ was adjusted daily to achieve a target of $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ as calculated for each animal based on daily water intake. After a 48-h allopurinol pretreatment, hindlimb unloading was accomplished using the method of Morey-Holton and Globus (2002), a standard model used to unload antigravity muscles. In brief, Elastoplast tape was wrapped along the long axis of each animal's tail. A metal clip on the tape was attached to a nylon monofilament line via a stainless steel swivel. The distal end of the nylon line was attached to an overhead support and was shortened to suspend the animal in a 45° head-down tilt position. The swivel enabled the animal to explore the cage (360° range of motion) and obtain food and water freely. Animals were observed daily for changes in appearance and activity. Each animal was weighed; food, water, and allopurinol intakes were recorded (Table 1); and the angle of hindlimb suspension was adjusted if necessary. After 14 days of conditioning, each animal was deeply anesthetized while hindlimb-suspended. The animal then was removed from the suspension device. Blood was obtained by venous puncture into heparin-containing tubes. Soleus muscles were excised, weighed, frozen in isopentane chilled with liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. Rats were then killed by an overdose of the anaesthetic.

Xanthine oxidase activity

XO activity was measured in plasma and soleus by the fluorimetric method described in Beckman et al. (1989). Briefly, isoxanthopterin formation from pterine was followed by fluorimetry (excitation at 345 nm and emission at 390 nm).

Nuclear and Cytosolic Fractionation

Nuclear and cytosolic proteins were extracted from soleus muscle according to a modified protocol of Dignam et al. (1983). Approximately 50 mg of soleus muscles were homogenized in 1 mL ice-cold buffer A [10 mM Tris-pH 7.4, 0.5M Sucrose, 50mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM Sodium Pyrophosphate, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 100 μM Sodium orthovanadate, 50 mM Sodium fluoride] supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The homogenized tissue was incubated on ice for 30 min. The samples were then centrifuged at 1500 G for

10 min at 4°C. The supernatant (cytosolic fraction) was removed and the nuclear pellet was resuspended in 400 µl of buffer B [10 mM Tris-pH 7.4, 0.5M Sucrose, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM Sodium Pyrophosphate, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 100 µM Sodium orthovanadate, 50 mM Sodium fluoride]. The samples were vortexed for 15 s, sonicated on ice (3 times / 10s) and incubated on ice for 30 min. The tubes were then centrifuged at 14000 RPM (Sigma 2-16K) for 15 min. The supernatant containing the nuclear proteins was aliquoted and frozen at -80 °C. The Lowry protein assay was used to quantify the total protein content of samples.

Immunoblotting

Proteins from muscle cytosolic or nuclear fractions (40-120 µg of proteins) were resolved on 12.5% and 15% SDS-PAGE gels depending on the molecular weight of the protein of interest. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibodies: anti-CuZnSOD (1:5000, NovusBio), anti-MnSOD (1:5000, Assay Design), anti-catalase (1:5000, Sigma Aldrich, Missouri), anti-IKKα (1:1000, Cell Signaling), anti-Phospho-IKKα (1:1000, Cell Signaling), anti-IκBα (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-IκBα (1:1000, Cell Signaling), anti-NF-κB p65 (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-NF-κB p65 (1:1000, Cell Signaling), anti-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling) and α-actin (1:700, Sigma Aldrich). Thereafter, membranes were incubated with a secondary antibody for 1 h at room temperature. Specific proteins were visualized by using the enhanced chemiluminescence procedure as specified by the manufacturer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Autoradiographic signals were assessed by using a scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA).

Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction

RNA was isolated from skeletal muscles with the kit PARIS Protein and RNA Isolation System (Ambion, Austin, TX) following the manufacturer's instructions. For reverse transcription (RT) reactions, 1 µg of the purified RNA were reverse transcribed using random hexamers with the HighCapacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). RT conditions comprised an initial incubation step at 25°C for 10 min to allow random hexamers annealing, followed by cDNA synthesis at 37°C for 120 min, and a final inactivation step for 5 min at 95°C.

The levels of mRNA expression were measured by real-time quantitative PCR using the ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Specific primers and Taqman probes (Applied Biosystems) used for these experiments were: MuRF1 (Assay ID: Rn00590197_m1), MAFbx (Rn00591730_m1) and cyclophilin (Rn00690933_m1). PCR conditions were 10 min at 95°C for enzyme activation, followed by 40 two-step cycles (15 s at 95°C, 1 min at 60°C). The levels of cyclophilin mRNA expression were measured in all samples to normalize the

gene expressions for sample-to-sample differences in RNA input, RNA quality, and reverse transcription efficiency. The threshold cycle (Ct) was determined, and the relative gene expression was expressed as follows: fold change $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Protein carbonylation

Oxidative modification of total proteins in cytosolic fractions was assessed by immunoblot detection of protein carbonyl groups using the 'OxyBlot' protein oxidation kit (InterGen) as previously described (Romagnoli et al. 2010). The procedure to quantify total protein carbonyls with the OxyBlot kit was densitometry of the oxyblot and of the Ponceau red staining, followed by finding the ratio between the total density in the oxyblot and the total density in the Ponceau red staining.

NF-κB p65 DNA binding activity

DNA binding was determined using the TransAM™ NF-κB p65 assay kit (Active Motif, Carlsbad, CA) in accordance with the manufacturer's instructions. Sample absorbance was directly compared between individual nuclear extracts on individual plates and normalized to a standard amount of positive control (2.5 µg Jurkat nuclear extract).

Statistics

Results are expressed as means ± SDs. Normality of distribution was checked with the Kolmogorov test, and homogeneity of variance was tested by Levene's statistics. To test for statistically significant differences between the groups, two-way ANOVA was used. When significant F-ratios were observed, a Bonferroni multiple comparisons test was applied to test individual means. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$ and results are expressed as means ± SD.

RESULTS

Allopurinol supplementation limits muscle atrophy associated with hindlimb unloading

Soleus muscle mass, in relative values, is shown in Figure 1. Soleus muscle atrophy (-49%, $p < 0.001$) induced by 14 days of hindlimb unloading was reduced to only 30% under allopurinol treatment ($p < 0.01$ vs unloaded group with water). Allopurinol did not affect soleus muscle mass in the control group.

Muscular inactivity activates plasma and muscle XO: prevention by allopurinol

Rat plasma and soleus muscle XO activity increased after 2 weeks of hindlimb unloading (Figure 2AB). As expected, treatment with allopurinol completely inhibited XO activation. As shown in Figure 3, hindlimb unloading caused a significant increase in skeletal muscle oxidative stress evidenced by carbonylation of soleus proteins. A protein(s) with a molecular weight of 65 kDa was significantly carbonylated in muscle of unloaded rats (Figure 3A). We also determined plasma protein carbonylation in our animals. Figure 3B shows a significant increase in the carbonylation of low-

molecular weight proteins (less than 50 kDa) in the samples of the unloaded animals that received water. Allopurinol treatment partially prevented the unloading-induced protein oxidation. Hindlimb unloading similarly increased the protein levels of the cytosolic CuZnSOD in the soleus muscle of both UW and UA rats (Figure 3C). Catalase protein levels were also elevated in the soleus muscle of the unloaded animals. However, treatment with allopurinol prevented the unloading-induced increase in this enzyme (Figure 3D).

NF- κ B and p38 MAPK signalling pathways

We tested whether XO-derived ROS were involved in the activation of NF- κ B signalling pathway in soleus muscle. We found that both p65 protein content (NF- κ B subunit) and NF- κ B activity increased after 14 days of hindlimb unloading (Figure 4C and Figure 5D, respectively). Allopurinol treatment reduced NF- κ B activity without concomitant prevention of p65 nuclear translocation. We also found a striking significant increase in the p65 nuclear protein levels in the control animals treated with allopurinol.

Phosphorylation of I κ B α sets the stage for the dissociation and nuclear translocation of the active p50/p65 complex. This is why we examined whether the increased p65 NF- κ B subunit translocation to the nucleus was associated with phosphorylation and degradation of I κ B α . In the control animals, most of the I κ B α protein was in the non-phosphorylated form and little was present in the phosphorylated form. Soleus muscle from the unloaded rats showed a marked reduction of I κ B α and a corresponding increase in p-I κ B α . Again the unloading effect over I κ B α and p-I κ B α was not abolished by treatment with allopurinol (See Figure 4AB).

Since I κ B phosphorylation is controlled by IKK in most cells, we measured the content of IKK α and its active form p-IKK α in soleus muscle. Unloaded rats showed a marked reduction of IKK α and an increase in p-IKK α (See Figure 5A). However, allopurinol administration in this case significantly inhibited the IKK α activation.

Figure 5 shows a significant increase in the phosphorylation of both p65 and p38 MAPK in the soleus muscle of the unloaded animals. These two components are recognized to control NF- κ B transcriptional activity by posttranslational modifications such as phosphorylation and acetylation (Madrid et al. 2000; Jijon et al. 2004). Allopurinol treatment completely prevented the p38 phosphorylation (See Figure 5B) but also prevented the phosphorylation of the p65 subunit (See Figure 5C). The content of α -actin, a housekeeping protein marker in muscle, was not altered in the various treatment groups of rats (data not shown).

Muscular inactivity increases E3 ubiquitine ligases expression: prevention by allopurinol

To finally identify the mechanism by which allopurinol prevents the loss of muscle mass after hindlimb unloading and the possible implication of the NF- κ B signalling pathway, we determined the expression, in soleus muscle, of two well known muscle specific E3 ubiquitin ligases involved in several *in vivo* models of skeletal muscle atrophy, MAFbx and MuRF-1 (Foletta et al. 2011). As shown in Figure 6, hindlimb unloading caused significant increase in MAFbx mRNA expression whereas a trend to increase is observed for MuRF1 mRNA expression (Panel A and B). These increases were prevented in animals treated with allopurinol.

DISCUSSION

XO is involved in the oxidative stress and soleus muscle atrophy associated to hindlimb unloading.

Eighteen years ago, Kondo and co-workers first observed that muscle atrophy caused by hindlimb unloading was associated with an increase in lipid peroxidation and oxidized glutathione in rat skeletal muscle (Kondo et al. 1993a). This first study was followed by substantial investigations in rodents confirming that muscular inactivity induces oxidative stress in skeletal muscle (Koesterer et al. 2002; Lawler et al. 2003). Interestingly, rodents supplemented with vitamin E (Appell et al. 1997; Servais et al. 2007), Bowman-Birk inhibitor concentrate (soy protein with antioxidant properties) (Arbogast et al. 2007) and resveratrol (Jackson et al. 2010) during a period of hindlimb unloading exhibit less oxidative damage and muscle atrophy, suggesting that ROS contribute to the inactivity-related skeletal muscle atrophy. However, the source(s) of ROS production in the unloading models is still a subject of debate. In the pioneer work by Kondo and co-workers the authors pointed to XO as the main source of ROS production in the atrophied muscles (Kondo et al. 1993a). Several years later Matuszczak et al. found that administration of allopurinol in mice had protective effects during hindlimb unloading (Matuszczak et al. 2004). Although the XO inhibitor did not decrease the atrophy caused by prolonged unloading it blunted the contractile dysfunction in soleus muscles. More recently the group of Scott K. Powers (Whidden et al. 2009) showed that XO is involved in mechanical ventilation-induced oxidative injury and contractile dysfunction in the diaphragm. Respiratory muscle weakness produced by mechanical ventilation is due to diaphragmatic contractile dysfunction and atrophy and is directly linked to oxidative stress (Better et al. 2004). However, the molecular mechanisms involved in the XO-mediated skeletal muscle atrophy are not well understood. We have previously reported that inhibition of XO with allopurinol prevents the exercise-induced oxidative stress in skeletal muscle by inhibiting the MAPK–NF- κ B signalling pathways (Gomez-Cabrera et al. 2003; Gomez-Cabrera et al. 2005). Thus, we aimed to determine the mechanism by which XO-derived ROS cause unloading-induced muscle atrophy and its possible prevention by allopurinol.

We found a significant increase in plasma and soleus muscle XO activity associated to hindlimb unloading that was prevented completely by allopurinol treatment (See Figure 2). Whidden et al. (2009) also found an increase in XO activity in the diaphragm during mechanical ventilation and a prevention after oxypurinol administration. Although we have not explored the mechanism involved in the activation of XO during unloading it is generally known that the Ca^{+2} -activated proteases participate in the conversion of XDH into XO (McCord 1985). Kondo and coworkers reported an increase of intracellular Ca^{+2} in atrophy muscles using electron probe X-ray microanalysis (Kondo et al. 1992). Thus, the increased intracellular Ca^{+2} might enhance the enzyme conversion in the atrophied muscle through the activation of proteases (Kondo et al. 1993a).

Allopurinol supplementation during prolonged hindlimb unloading contributed to partially limit systemic and muscular oxidative damage (i.e. protein oxidation). We found a significant increase in the protein carbonylation in the plasma and soleus muscle of the unloaded animals (See Figure 3) that was not completely prevented by allopurinol. The failure of allopurinol (or oxypurinol) to completely blunt the oxidative stress in skeletal muscle using different unloading models has been previously reported (Matuszczak et al. 2004; Whidden et al. 2009).

A complex cytoprotective system that include antioxidant enzymes is recruited against free radical damage. As previously observed by different research groups unloading induced the expression of the antioxidant enzymes catalase and CuZnSOD in soleus muscle (Matuszczak et al. 2004; Servais et al. 2007). These responses suggest that the muscle is adapting to the oxidative stress. Allopurinol administration did not modulate the skeletal muscle antioxidant enzymes levels (See Figure 3). Thus, our data supports the idea that XO is not the only source of ROS production in the skeletal muscle during hindlimb unloading.

Canonical NF- κ B pathway is activated during hindlimb unloading

A very relevant link between oxidative and muscle disuse atrophy involves the redox regulation of the NF- κ B family of transcriptional activators. Since this discovery, accumulating evidence indicates that a specific NF- κ B pathway is required for disuse muscle atrophy (Cai et al. 2004; Kandarian and Jackman 2006). NF- κ B is activated via phosphorylation of I κ B at Ser-32 and Ser-36 by I κ B kinase (IKK). Phosphorylation of I κ B sets the stage for the dissociation and nuclear translocation of the active P50/P65 complex, which binds the corresponding DNA sequence of the target genes (Baeuerle and Henkel 1994). In the current study, we have demonstrated that hindlimb unloading can activate NF- κ B signalling pathway in rat skeletal muscle. We have found a significant increase in the soleus nuclear content of the p65 (NF- κ B) subunit after 14 days of hindlimb unloading. This NF- κ B activation is accompanied by an increase in I κ B α phosphorylation and a decrease in I κ B α content in

the cytosol. Accordingly we have found a marked reduction of IKK α (the I κ B Kinase) and an increase in p-IKK α during unloading (See Figure 5). Our results do not confirm those reported by Hunter and co-workers in 2002. They found a marked increase in the nuclear level of NF- κ B in soleus muscle extracts from unloaded rats but no evidence for the canonical NF- κ B pathway involving activation of p65 or I κ B α was reported by these authors (Hunter et al. 2002). However, five years later it was shown that the I κ B α degradation was required for the unloading-induced decrease in fiber size, increase in protein ubiquitination, activation of NF- κ B signaling, and the expression of specific atrophy genes (Judge et al. 2007). Regarding the I κ B Kinase it has been shown, using DNA injection and electroporation experiments, that both IKK α and IKK β are necessary and sufficient to induce muscle atrophy (Van Gammeren et al. 2009).

Previous works have shown that pharmacological inhibition of the NF- κ B pathway, with sodium salicylate, is sufficient to partially suppress the atrophic phenotype in mice with a muscle-specific transgenic expression of activated I κ B Kinase β (Cai et al. 2004). Thus, we aimed to determine whether administration of allopurinol which partially prevented the loss of muscle mass after hindlimb unloading, mediates its effects through the NF- κ B pathway. Although we found a clear activation of the NF- κ B pathway in the soleus muscle of the unloaded animals, treatment with allopurinol only prevented the phosphorylation of IKK α , neither the phosphorylation of I κ B nor the translocation to the nucleus of p65 subunit were prevented after XO inhibition. Sizemore et al. (2002) demonstrated that the α and β subunit of IKK had distinct roles in the regulation of the p65-p50 heterodimer. Whereas IKK β is required for both NF- κ B translocation and p65 phosphorylation, IKK α is required solely for the phosphorylation and activation of the p65 subunit of NF- κ B. Due to the lack of sample availability we did not measure IKK β phosphorylation, but we can't exclude that treatment with allopurinol only prevent IKK α phosphorylation and does not act on IKK β isoform.

Role of XO-derived ROS in the activation of the p38MAPK and NF- κ B skeletal muscle signalling pathways during hindlimb unloading.

NF- κ B transcriptional activity is also controlled by posttranslational modifications such as phosphorylation and acetylation (Madrid et al. 2000). In 2004 it was reported that NF- κ B transcriptional activity could be increased in an IKK α dependent manner but independently of I κ B α degradation and p65 nuclear translocation (Jijon et al. 2004). p38 MAPK is an essential component of the cell signalling pathway leading to p65 phosphorylation and NF- κ B transcriptional activation (Jijon et al. 2004; Kefaloyianni et al. 2006). Apart from NF- κ B, p38 MAPK provides another potential link between oxidative stress and skeletal muscle atrophy (Powers et al. 2007). This is why we determined both the phosphorylation of the p65 NF- κ B subunit and of the p38 MAPK in the cytosol of the soleus

muscle samples. We found a significant increase in the p-p65 and p-p38 in the soleus muscle of the unloaded animals. Allopurinol treatment completely prevented the p38 phosphorylation but also the phosphorylation of the p65 subunit (See Figure 5). At the same time, we found that hindlimb unloading increased NF- κ B activity, but that treatment with allopurinol partially prevents this activation (Figure 5D). Taking account the lack of prevention of p65 translocation with allopurinol treatment, all these results suggest that XO-derived ROS increased NF- κ B activity in unloaded animals in part through p38 MAPK, but irrespective of I κ B degradation.

To finally identify the mechanism by which allopurinol prevents the loss of muscle mass after hindlimb unloading and the possible implication of the NF- κ B signalling pathway, we determined the expression of two well known muscle specific E3 ubiquitin ligases involved in several in vivo models of skeletal muscle atrophy, MAFbx and MuRF-1 (Foletta et al. 2011). MAFbx and/or MuRF-1 mRNA are up-regulated following immobilization in humans, hibernating squirrels, mice and rats (Foletta et al. 2011). The increases in MAFbx and MuRF-1 are associated with immobilization-induced increases in proteasome dependent proteolysis but treatments such as vitamin E (Servais et al. 2007) and resistance exercise (Haddad et al. 2006) blunt the induction of the atrogenes following hindlimb unloading. MuRF-1 transcription, but not MAFbx, is increased by NF- κ B (Cai et al. 2004), while it has been shown that p38 activity stimulates the expression of MAFbx (Li et al. 2005). Similarly to IKK α , p38 MAPK, p65 and NF- κ B activities, we found that hindlimb unloading induced the expression of MuRF-1 and MAFbx in soleus muscle and that allopurinol treatment prevents these overexpressions (See Figure 6). p38 MAPK activity is probably related to MAFbx mRNA increases in skeletal muscle of unloaded animals even if we did not identify the intermediate target of this pathway. As suggested by Li and al. (Li et al. 2005), one possibility is that p38 MAPK contributes to the activation of Foxo (forkhead-type) transcription factors as Foxo constitutes a key regulator of MAFbx expression in skeletal muscle (Sandri et al. 2004). On the other, p38 MAPK and IKK α could also regulate MuRF-1 expression during hindlimb unloading by stimulating p65 phosphorylation (Jijon et al. 2004; Kefaloyianni et al. 2006), and consequently the NF- κ B DNA binding activity.

Conclusion

Collectively, our data suggest that XO-induced oxidative stress is involved in the activation of the p38 MAPK-MAFbx pathway in unloaded muscle atrophy. We have demonstrated that allopurinol treatment, during unloading, completely prevents the activation of XO but partially prevents the protein carbonylation and the loss of muscle mass in soleus muscle. Two of the main oxidative-stress signalling cascades NF- κ B and the p38-MAPK, are activated after 14 days of hindlimb unloading.

This activation lead to the increase in the mRNA expression of the proteolytic E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and MAFbx in soleus muscle. Allopurinol treatment significantly prevents the activation of the p38 MAPK-MAFbx pathway but also the NF- κ B-MuRF-1 one. Our results demonstrate that p38 MAPK promotes skeletal muscle atrophy during immobilization – first, by stimulating MAFbx expression, and second, by stimulating with IKK α the NF- κ B-MuRF-1 pathway through a I κ B independant mechanism. A schematic interpretation of these pathways is in Figure 7.

Our data support the idea that XO is not the only source of ROS production in the skeletal muscle during hindlimb unloading, but point out the potential benefit of allopurinol administration for astronauts, bedridden and maybe sarcopenic individuals. Recent findings showing that inhibition of XO reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated in aged mice (Ryan et al. 2011b) open up the possibility of the potential benefits of allopurinol administration in sarcopenic humans.

REFERENCES

- Appell, HJ, Duarte, JA, et al. (1997). Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med*, 18 (3), 157-160.
- Arbogast, S, Smith, J, et al. (2007). Bowman-Birk inhibitor concentrate prevents atrophy, weakness, and oxidative stress in soleus muscle of hindlimb-unloaded mice. *J Appl Physiol*, 102 (3), 956-964.
- Baeuerle, PA and Henkel, T (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12 141-179.
- Barreiro, E, Gea, J, et al. (2005). Protein carbonyl formation in the diaphragm. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32 (1), 9-17.
- Beckman, JS, Parks, DA, et al. (1989). A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med*, 6 (6), 607-615.
- Betters, JL, Criswell, DS, et al. (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (11), 1179-1184.
- Cai, D, Frantz, JD, et al. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, 119 (2), 285-298.
- Childs, TE, Spangenburg, EE, et al. (2003). Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285 (2), C391-398.
- Dignam, JD, Lebovitz, RM, et al. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11 (5), 1475-1489.
- Foletta, VC, White, LJ, et al. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch*, 461 (3), 325-335.
- Gomez-Cabrera, MC, Borrás, C, et al. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567 (Pt 1), 113-120.
- Gomez-Cabrera, MC, Martinez, A, et al. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr*, 96 Suppl 1 S31-33.
- Gomez-Cabrera, MC, Pallardo, FV, et al. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA*, 289 (19), 2503-2504.
- Haddad, F, Adams, GR, et al. (2006). Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J Appl Physiol*, 100 (2), 433-441.

- Hofer, T, Marzetti, E, et al. (2008). Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp Gerontol*, 43 (6), 563-570.
- Hunter, RB, Stevenson, E, et al. (2002). Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J*, 16 (6), 529-538.
- Ibrahim, B and Stoward, PJ (1978). The histochemical localization of xanthine oxidase. *Histochem J*, 10 (5), 615-617.
- Jackson, JR, Ryan, MJ, et al. (2010). Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299 (6), R1572-1581.
- Jijon, H, Allard, B, et al. (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell Signal*, 16 (9), 1023-1032.
- Judge, AR, Koncarevic, A, et al. (2007). Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292 (1), C372-382.
- Kandarian, SC and Jackman, RW (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*, 33 (2), 155-165.
- Kedar, V, McDonough, H, et al. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (52), 18135-18140.
- Kefaloyianni, E, Gaitanaki, C, et al. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 18 (12), 2238-2251.
- Klein, AS, Joh, JW, et al. (1996). Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med*, 21 (5), 713-717.
- Koesterer, TJ, Dodd, SL, et al. (2002). Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. *J Appl Physiol*, 93 (6), 1959-1965.
- Kondo, H, Kodama, J, et al. (1993a). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett*, 326 (1-3), 189-191.
- Kondo, H, Miura, M, et al. (1992). Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 262 (5 Pt 1), E583-590.
- Kondo, H, Nakagaki, I, et al. (1993b). Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 265 (6 Pt 1), E839-844.
- Lawler, JM, Song, W, et al. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 35 (1), 9-16.
- Lecker, SH, Solomon, V, et al. (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 129 (1S Suppl), 227S-237S.
- Li, H, Malhotra, S, et al. (2008). Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med*, 86 (10), 1113-1126.
- Li, HH, Kedar, V, et al. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest*, 114 (8), 1058-1071.
- Li, YP, Chen, Y, et al. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*, 19 (3), 362-370.
- Lynch, GS (2001). Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders. *Exerc Sport Sci Rev*, 29 (4), 141-148.
- Mador, MJ and Bozkanat, E (2001). Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2 (4), 216-224.
- Madrid, LV, Wang, CY, et al. (2000). Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, 20 (5), 1626-1638.
- Matuszczak, Y, Arbogast, S, et al. (2004). Allopurinol mitigates muscle contractile dysfunction caused by hindlimb unloading in mice. *Aviat Space Environ Med*, 75 (7), 581-588.
- McCord, JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 312 (3), 159-163.

- Moorhouse, PC, Grootveld, M, et al. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett*, 213 (1), 23-28.
- Morey-Holton, ER and Globus, RK (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol*, 92 (4), 1367-1377.
- Oishi, Y, Ogata, T, et al. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiol (Oxf)*, 192 (3), 381-395.
- Powers, SK, Duarte, J, et al. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, 95 (1), 1-9.
- Powers, SK, Kavazis, AN, et al. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 102 (6), 2389-2397.
- Romagnoli, M, Gomez-Cabrera, MC, et al. (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 49 (2), 171-177.
- Ryan, MJ, Jackson, JR, et al. (2011). Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. *Free Radic Biol Med*, 51 (1), 38-52.
- Sandri, M, Sandri, C, et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117 (3), 399-412.
- Servais, S, Letexier, D, et al. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med*, 42 (5), 627-635.
- Shavlakadze, T and Grounds, M (2006). Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat. *Bioessays*, 28 (10), 994-1009.
- Siu, PM (2009). Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. *Med Sci Sports Exerc*, 41 (10), 1876-1886.
- Sizemore, N, Lerner, N, et al. (2002). Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 277 (6), 3863-3869.
- Van Gammeren, D, Damrauer, JS, et al. (2009). The IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB J*, 23 (2), 362-370.
- Vazeille, E, Codran, A, et al. (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295 (5), E1181-1190.
- Whidden, MA, McClung, JM, et al. (2009). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol*, 106 (2), 385-394.
- Xu, X, Chen, CN, et al. (2010). Asymmetric superoxide release inside and outside the mitochondria in skeletal muscle under conditions of aging and disuse. *J Appl Physiol*, 109 (4), 1133-1139.
- Yimlamai, T, Dodd, SL, et al. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol*, 99 (1), 71-80.

Figure 1. Allopurinol supplementation limits muscle atrophy associated with hindlimb unloading. Mean (\pm SD) results of soleus weight of control with water rats ($n = 9$), control with allopurinol rats ($n = 9$), unloading with water rats ($n=7$) and unloading with allopurinol rats ($n=7$). A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

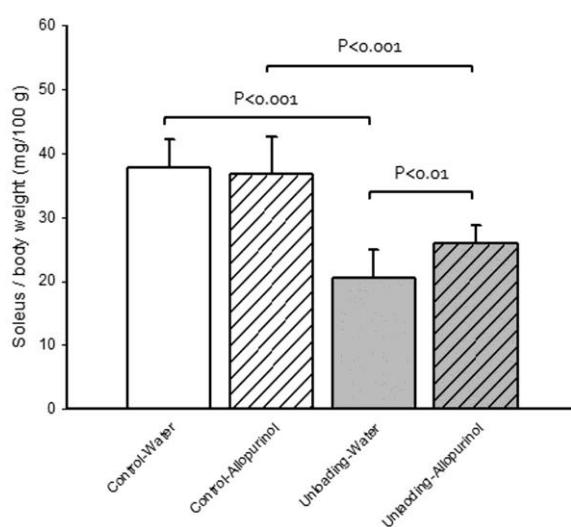


Figure 2. Muscular inactivity activates plasma and muscle XO: prevention by allopurinol. Mean (\pm SD) results of xanthine oxidase activity in plasma (A) and soleus (B) of control rats with water (n = 9), control rats with allopurinol (n = 9), unloading rats with water (n=7) and unloading rats with allopurinol (n =7). A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

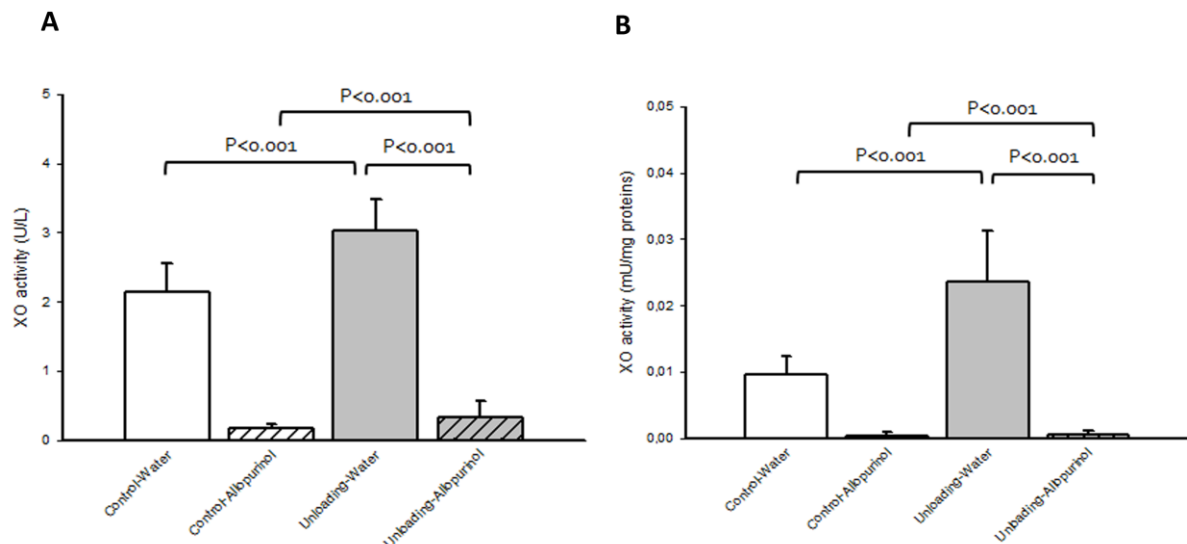


Figure 3. Effects of hindlimb unloading and allopurinol supplementation on oxidative damage markers in skeletal muscle. Mean (\pm SD) results of proteins carbonylated (A), CuZnSOD (C) and catalase (D) levels in soleus of control rats with water ($n = 9$), control rats with allopurinol ($n = 9$), unloading rats with water ($n=7$) and unloading rats with allopurinol ($n = 7$). The figure B represents carbonylation of light protein (less than 50 kDa) in plasma of the same animals. A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

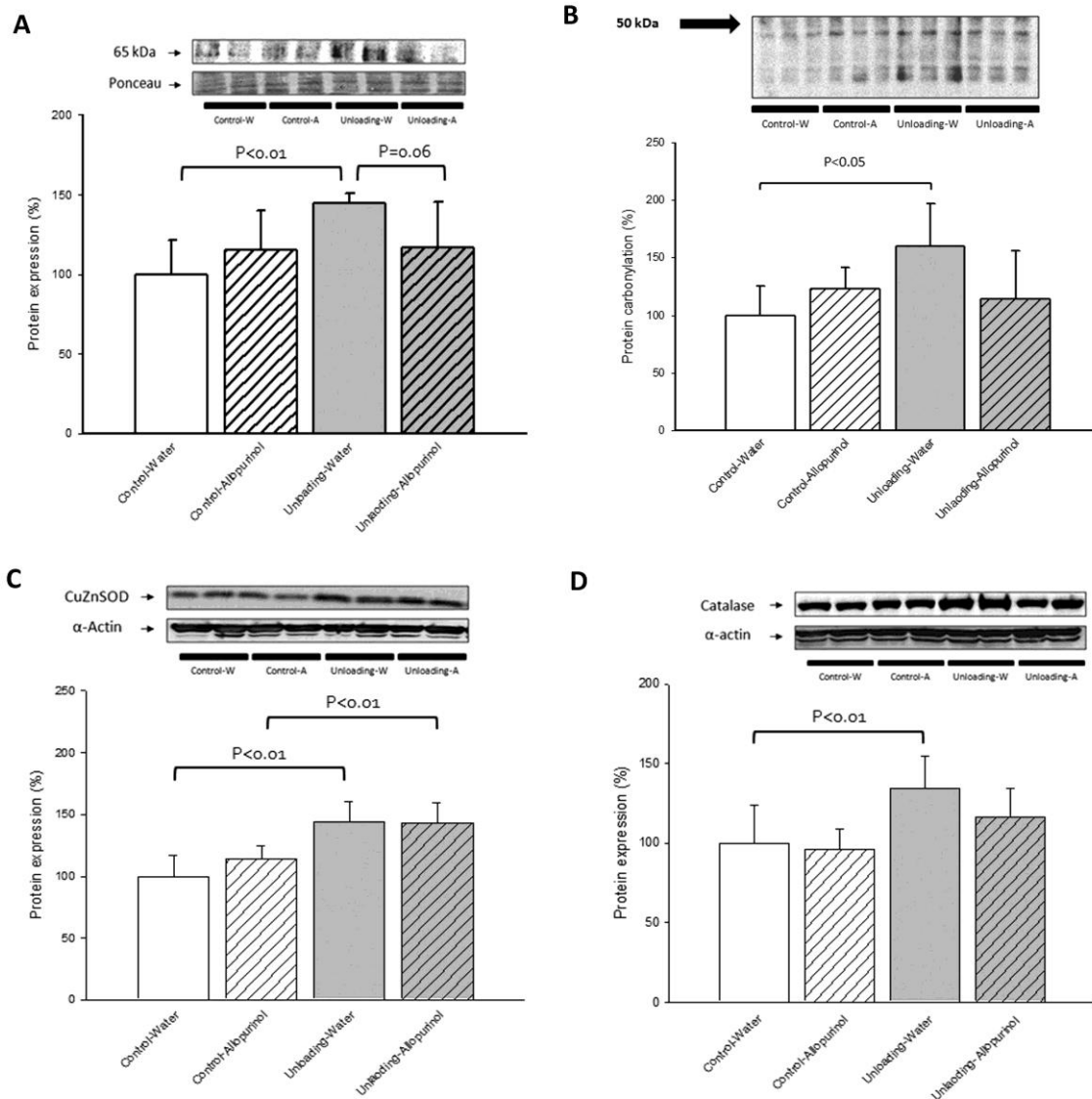


Figure 4. Canonical NF- κ B pathway is activated during muscular inactivity. Mean (\pm SD) results of cytosolic p-I κ B α (A), cytosolic I κ B α (B) and nuclear NF- κ B p65 protein content (C) in soleus of control rats with water (n = 9), control rats with allopurinol (n = 9), unloading rats with water (n=7) and unloading rats with allopurinol (n =7). A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

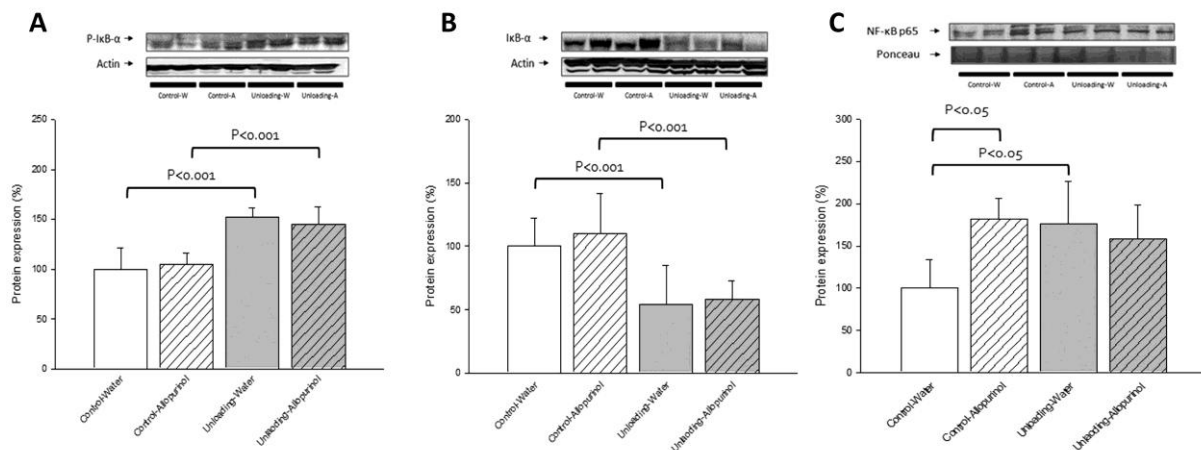


Figure 5. Inactivity-induced ROS activate p38 MAP kinase and NF- κ B p65 pathway. Mean (\pm SD) results of cytosolic IKK α (A), p38 MAPK (B), NF- κ B p65 (C) activations of control with water rats (n = 9), control with allopurinol rats (n = 9), unloading with water rats (n=7) and unloading with allopurinol rats (n=7). Activation levels were expressed as ratio phosphorylated protein content / total protein content. Nuclear NF- κ B p65 activation corresponds to the DNA-binding of the complex (D). A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

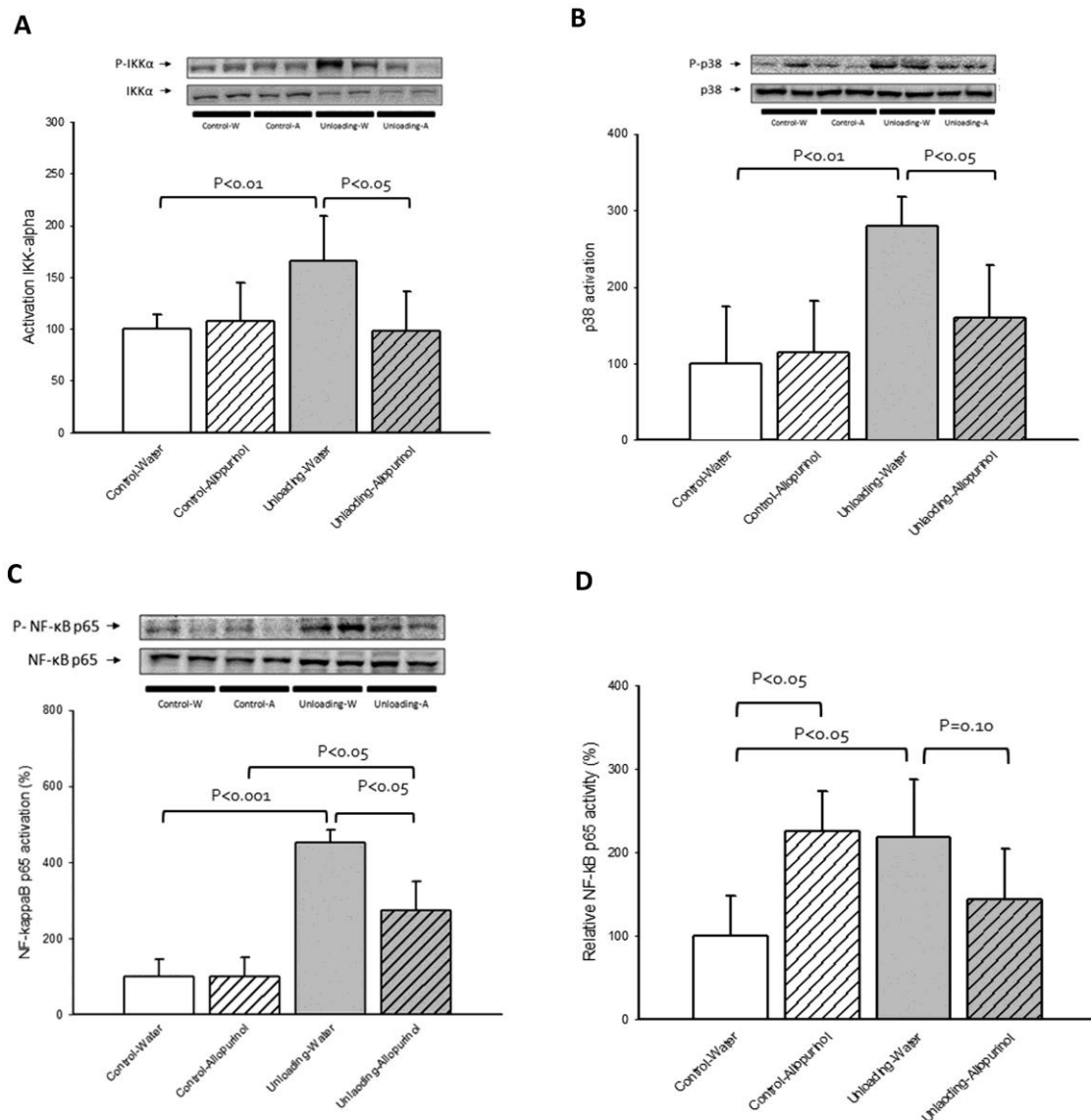


Figure 6. Muscular inactivity activates E3 ubiquitin ligases: prevention by allopurinol. Mean (\pm SD) results of MAFbx mRNA (A) and MuRF1 mRNA expressions (B) in soleus of control rats with water (n = 9), control rats with allopurinol (n = 9), unloading rats with water (n=7) and unloading rats with allopurinol (n =7). A two-factor ANOVA and post hoc Bonferroni's comparisons were used to identify significant differences.

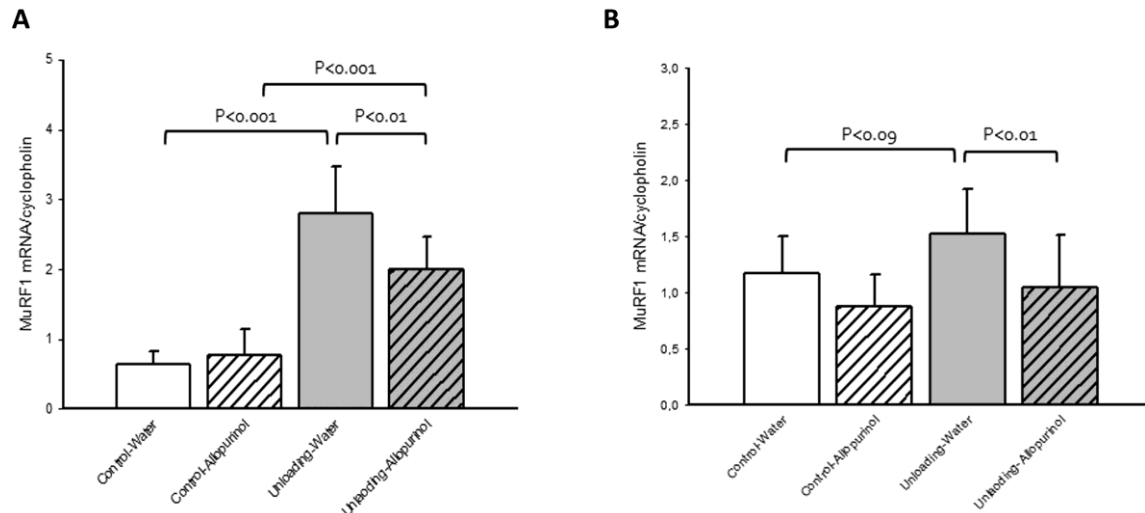
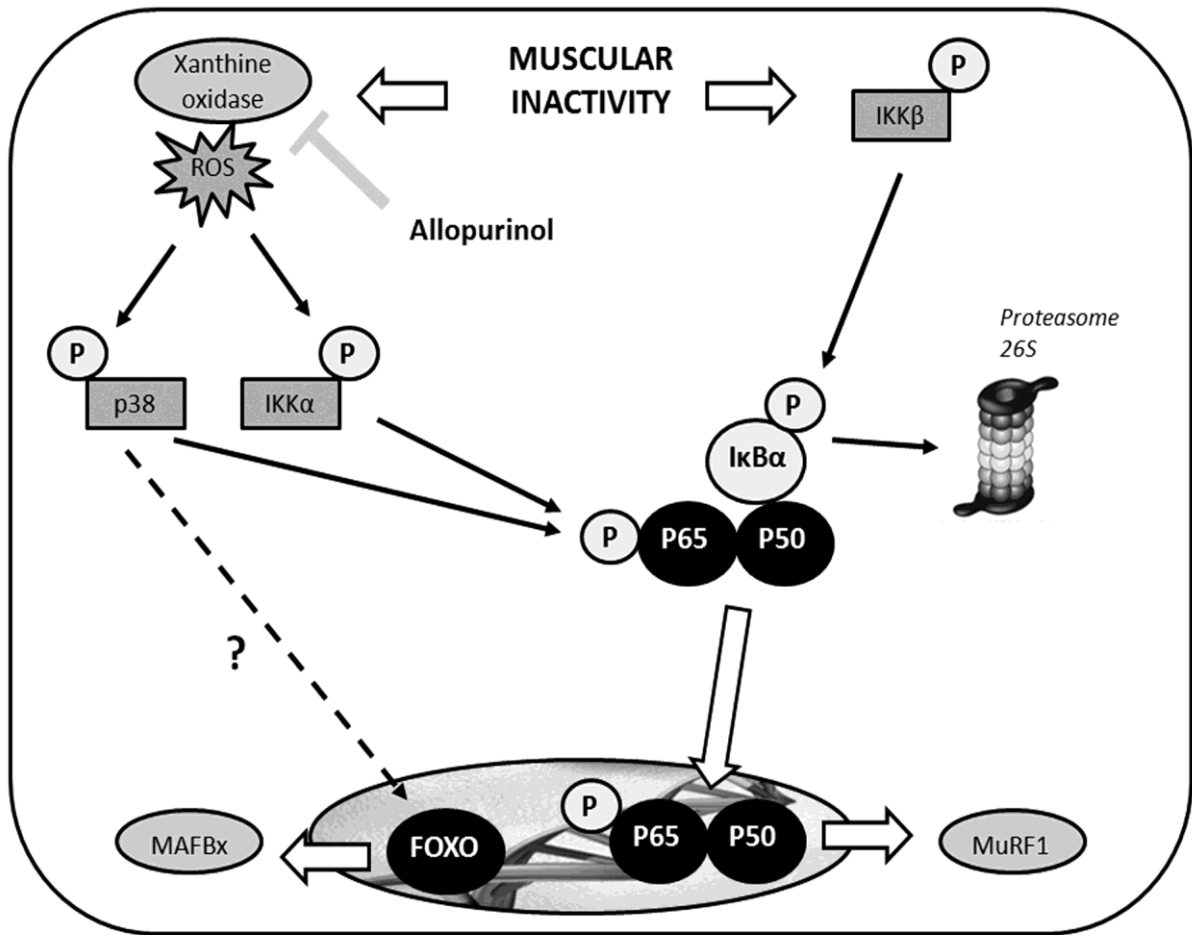


Figure 7. Proposed mechanism of the role of reactive oxygen species in signaling of NF- κ B during muscular inactivity.



Etude n°2 : Rôle des ERDO et de la myostatine dans la régulation des facteurs myogéniques au sein du tissu musculaire âgé

RESUME FRANCAIS

INTRODUCTION

La sarcopénie est un syndrome gériatrique qui se caractérise dans un premier temps par une diminution de la masse musculaire qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques (Cruz-Jentoft et al. 2010). Cette diminution de masse musculaire avec l'avance en âge s'explique classiquement par les altérations du turnover protéique (Combaret et al. 2009) et par une exacerbation du phénomène d'apoptose (Marzetti et al. 2008a). De plus en plus de travaux ont également mis en évidence l'importance de l'altération du fonctionnement des cellules satellites (SC) responsables du processus de régénération musculaire (Gallegly et al. 2004; Le Grand and Rudnicki 2007).

L'activation des SC quiescentes puis leur prolifération et différenciation constituent les différentes étapes du processus de régénération musculaire (Le Grand and Rudnicki 2007). Ce processus, appelé également myogenèse, est modulé par un certain nombre de facteurs cellulaires dont notamment les facteurs de régulation myogéniques (MRF) et les inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (CKI) (i.e. p16, p21 et p27) (Sabourin and Rudnicki 2000). Le potentiel de régénération musculaire est affecté avec l'avance en âge en raison d'une altération de l'activité des SC, et probablement de l'expression des MRF (i.e. MyoD, Myf-5, myogenin, et MRF-4) (Le Grand and Rudnicki 2007). De plus en plus de travaux indiquent que le microenvironnement, dans lequel se situent les SC, constitue le principal facteur responsable de la réduction de l'activité des SC avec l'avance en âge (Carlson and Faulkner 1989; Conboy et al. 2005; Carlson and Conboy 2007). Les espèces principalement dérivées de l'oxygène (ERDO) produites au niveau du tissu musculaire constituent de possibles candidats responsables de la réduction de l'activité des SC avec l'avance en âge. Plusieurs travaux menés sur des cellules C2C12 ont effet démontré que la réduction de l'environnement pro-oxydant favorisait la prolifération et la différenciation des myoblastes (Renault et al. 2002; Ardite et al. 2004; Hansen et al. 2007a). Par ailleurs, la myostatine pourrait également être un élément clé du microenvironnement des SC à l'origine de la diminution de leur activité dans le tissu musculaire âgé (Le Grand and Rudnicki 2007). Plusieurs études menées en culture cellulaire ont ainsi démontré le rôle inhibiteur de la myostatine sur la différenciation des SC (Langley et al. 2002), mais également sur leur prolifération en favorisant la surexpression de la CKI p21 (Thomas et al. 2000). Si l'implication des ERDO et de la myostatine dans le processus de régénération musculaire est reconnue

en culture cellulaire, leur rôle dans la régénération musculaire sur des modèles *in vivo* de vieillissement demande à être établi. Par conséquent, le but de cette étude est de déterminer l'implication des ERDO et de la myostatine dans la régulation de l'expression des MRF et CKI *in vivo* au sein du muscle de rongeurs âgés.

MATERIELS ET METHODES

Cette expérimentation est effectuée sur des muscles gastrocnémiens de rats Wistar mâles jeunes (3 mois, n=6) et âgés (24 mois, n=6). Ces animaux ont été élevés dans des conditions contrôlées de température, d'hygrométrie et d'éclairage et bénéficiaient d'un accès ad libitum en eau et nourriture. L'ensemble des détails du protocole expérimental ainsi que les analyses effectuées dans le cadre de cette étude figurent dans la partie Annexes (i.e. Fiches techniques n° 9-29).

RESULTATS

Nous observons que l'avance en âge s'accompagne d'une augmentation de l'ARNm codant pour les facteurs de régulation myogénique Myf-5, MyoD et myogénine dans le muscle gastrocnémien. Ces augmentations d'ARNm apparaissent pourtant inefficaces pour augmenter le contenu protéique des MRF comme en témoigne l'absence de modifications de l'expression protéique de Myf-5, MyoD et de la myogénine dans le muscle âgé. Ces résultats indiquent pour la première fois que des altérations post-transcriptionnelles pourraient limiter l'expression des MRF dans le tissu musculaire âgé, et donc probablement influencer l'activité des SC.

Nous observons également que l'avance en âge cause une augmentation de l'ARNm et du contenu protéique de la p21 dans le tissu musculaire. Cette surexpression est associée à une augmentation du contenu protéique en myostatine, mais également à un stress oxydant chronique comme en témoignent les augmentations de l'activité de la xanthine oxydase, du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) ainsi que de la carbonylation des protéines. Par ailleurs, nous constatons que l'avance en âge cause une hyperphosphorylation de la kinase redox-sensible p38 MAPK au sein du tissu musculaire. L'ensemble de ces résultats mettent en évidence un potentiel mécanisme à l'origine de la réduction avec l'âge des capacités prolifératives des SC, et dans lequel la p38 MAPK pourrait jouer un rôle essentiel. Cette kinase est en effet reconnue pour jouer un rôle clé dans la stabilisation du contenu protéique de la p21 (Kim et al. 2002), et plusieurs travaux ont démontré que les ERDO et la myostatine stimulaient son activité (Thomas et al. 2000; Kefaloyianni et al. 2006). Ainsi, nos résultats supportent l'hypothèse que le stress oxydant chronique au sein du muscle pourrait induire une inhibition de la prolifération des SC selon la voie de signalisation : ROS / Myostatine → p38 MAPK → p21. La figure 5 propose un modèle intégrant ces données en schématisant cette nouvelle voie de signalisation.

CONCLUSION

Les résultats observés dans cette étude basée sur une approche *in vivo* montrent que la myostatine et les ERDO pourraient être des éléments clés du microenvironnement musculaire âgé responsables de l'altération du fonctionnement des SC en modulant l'expression des MRF et de la p21. Néanmoins, davantage de travaux utilisant des traitements en antioxydants et/ou sur inhibiteurs de la myostatine dans le muscle âgé apparaissent nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Title: Role of ROS and myostatin in myogenic gene regulation in aged skeletal muscle

Running title: ROS, myostatin and skeletal muscle regeneration during aging

Authors: Frederic Derbré^{1,2}, Mari Carmen Gomez-Cabrera¹, Ana Lucia Nascimiento¹, Fabian Sanchis-Gomar¹, Vladimir E Martinez- Bello¹, Arlette Gratas-Delamarche² and Jose Viña¹.

¹Department of Physiology. University of Valencia. Fundacion Investigacion Hospital Clinico Universitario/INCLIVA. Spain.

²Laboratory “Movement Sport and health Sciences”, University Rennes. France

Correspondence:

Frédéric Derbré

Laboratory « Mouvement Sport Santé » (EA1274). University of Rennes 2, ENS Cachan.

UFR-APS. Avenue Charles Tillon CS 24414, 35044 Rennes Cedex, France.

Tel: 00 (33) (0) 2 99 14 17 75

Fax: 00 (33) (0) 2 99 14 17 74

Email: frederic.derbre@univ-rennes2.fr

Key Words: Sarcopenia, p38 MAPK, p21, satellite cells, MyoD

ROLE OF ROS AND MYOSTATIN IN MYOGENIC GENE REGULATION IN AGED SKELETAL MUSCLE

ABSTRACT

Skeletal muscle aging is characterized by impairments in regenerative processes that promote sarcopenia. The regenerative potential of skeletal muscle is reduced with aging due to a decline in both satellite cells (SC) number and activity. SC activity is modulated by a variety of local factors, including the myogenic regulatory factors (MRF) and the cyclin-dependant kinase inhibitors (CKI). Recent evidences showed that extrinsic microenvironment appears responsible to the age-related decrease of SC activity more than the intrinsic regenerative potential of SC. Consequently, this study was designed to study the involvement of intracellular factors like myostatin and reactive oxygen species (ROS) on the regulation of some key factors of myogenesis such as the MRF and the CKI. We observed that Myf-5, MyoD and myogenin mRNA increased with age, whereas its protein content remained stable. Aging also increased oxidative stress markers (protein carbonylation, glutathione status, xanthine oxidase activity and catalase expression), myostatin protein content and activated p38 MAPK. Expression of the CKI p21, an inhibitor of SC proliferation, was higher in aged skeletal muscle. Results reported here showed that myostatin and ROS could be key-elements of intracellular environment that impaired regenerative processes in aged skeletal muscle, by modulating MRFs and p21 expression. Further investigations using antioxidant treatments and myostatin inhibitors in aged animals are nevertheless required to confirm this hypothesis.

INTRODUCTION

Sarcopenia refers to the gradual loss of skeletal muscle mass and strength during the aging process. The resultant decline in functional capacity contributes to falls, fractures, and impaired mobility in older individuals (Doherty 2003). In rodents and humans, age-related myofiber loss and myofiber atrophy mainly involve type IIa and IIb fibers, with a greater impact seen in the IIb fibers (Lexell 1995; Welle et al. 2002). Among the various cellular mechanisms involved in muscle fiber atrophy, the altered function of muscle satellites cells (SC) responsible to muscle regeneration is considered as a major mechanism (Gallegly et al. 2004; Le Grand and Rudnicki 2007).

Activation of nominally quiescent SC is integral to the processes of repair or regeneration and growth in adult skeletal muscle (Le Grand and Rudnicki 2007). These processes are modulated by a variety of local factors, including the myogenic regulatory factors (MRF) (i.e. MyoD, Myf-5, myogenin, and MRF-4) and the cyclin-dependant kinase inhibitors (CKI) (Sabourin and Rudnicki 2000). The regenerative potential of skeletal muscle itself decreases with aging, this related to a reduction in SC function, and probably in MRF expression (Le Grand and Rudnicki 2007). Impairment in SC function as a source of new myonuclei can be related to a diminution of the SC pool since the abundance of quiescent SC declines with age in myofibers from skeletal muscle (Renault et al. 2002; Kadi et al. 2004; Verdijk et al. 2007), but it can also be related to decrease in SC activity. However, the down-sized population appears still able to support effective myogenesis *in vitro* (Shefer et al. 2006). Interestingly, the regenerative capacity and proliferation of SC in aged skeletal muscle appears restored when exposed to a young systemic environment by parabiotic pairings of young and aged animals or cross-transplantation (Carlson and Faulkner 1989; Conboy et al. 2005; Carlson and Conboy 2007) suggesting that the extrinsic microenvironment is responsible to the age-related reduction in SC activity.

Reactive oxygen species (ROS) constitute potential elements of the muscle microenvironment responsible to this age-related reduction in SC activity. Indeed recent *in vitro* studies have demonstrated that reducing redox environment promotes myoblasts proliferation (Renault et al. 2002) and differentiation (Ardite et al. 2004; Hansen et al. 2007a). On the other hand, myostatin, or growth and differentiation factor-8 (GDF-8), is a member of the transforming growth factor- β superfamily that is known to play an essential role in the regulation of skeletal muscle mass by inhibiting myoblast differentiation (Langley et al. 2002) in developing muscle. *In vitro* studies also showed that myostatin inhibits SC proliferation (Thomas et al. 2000), apparently by modulating key regulators of the cell cycle like the CKI (i.e. p21 and p27). If the negative roles on myogenesis played by ROS and myostatin are recognized *in vitro*, their effects on myogenesis *in vivo* in aged skeletal muscle remain to be elucidated. Therefore, the purpose of the study was to determine in aged skeletal muscle the

involvement of ROS and myostatin on the regulation of some key factors of myogenesis such as the MRF and the CKI.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male 3 (young) and 24 (aged) months of age Wistar rats, weighing respectively 200–250 g and 450–500 g at the beginning of the experiment. All animals were fed a rodent maintenance diet (Global diet 2014; Harlan Teklad, Madison, WI) and maintained at 23°C under a light/dark cycle of 12 h/12 h. We chose 24 months old rats since previous studies have reported that sarcopenia is evident at this age in this specie (Hopp 1993). Rats were anesthetized with xylazine (10 mg/kg) plus ketamine (16 mg/kg) by intraperitoneal injection. Gastrocnemius was removed quickly, freeze-clamped immediately and stored at –80°C until used. Rats were killed by an overdose of the anesthetic. The experimental protocol was approved by the Committee on Ethics in Research of the Faculty of Medicine of the University of Valencia.

Determination of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and carbonylated proteins

Reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels were determined in gastrocnemius by HPLC following the protocol described in Asensi et al. (1994). Briefly, muscle samples were respectively treated with 6% (vol/vol) perchloric acid containing 1 mmol/l EDTA (1:1) to determine GSH or with 6% perchloric acid containing 50 mmol/l N-ethyl-maleimide and 1 mmol/l EDTA to determine GSSG by high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were centrifuged for 10 min at 15000g, and the acidic supernatants were neutralized and used to determine glutathione. Protein carbonylation in gastrocnemius muscles was assessed by immunoblot detection of protein carbonyl groups using the ‘OxyBlot’ protein oxidation kit (Millipore, Massachusetts) following the manufacturer’s instructions. The procedure to quantify total protein carbonyls with the OxyBlot kit was densitometry of the oxyblot and of the Ponceau red staining, followed by finding the ratio between the total density in the oxyblot and the total density in the Ponceau red staining.

Determination of xanthine oxidase (XO) activity

XO activity was determined in skeletal muscle by a fluorimetric method (Beckman et al. 1989). Frozen gastrocnemius was homogenized with 5 volumes per gram of tissue of 0.25 M sucrose, 10 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1 mM EDTA and 50 mM K-phosphate, pH 7.4. Homogenates were centrifuged for 30 minutes at 15,000× g and activities measured in supernatants. XO activity was

measured by calculating the slope of the increase in fluorescence after adding pterin (0.010 mmol/L), which actually measures conversion of pterin to isoxanthopterin. The reaction was stopped by adding allopurinol (50 µmol/L). To calibrate the fluorescence signal, the activity of a standard concentration of isoxanthopterin was measured. Protein concentration of homogenates was determined by the Lowry assay.

Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction

RNA was isolated from skeletal muscles with the kit PARIS Protein and RNA Isolation System (Ambion, Austin, TX) following the manufacturer's instructions. For reverse transcription (RT) reactions, 1 µg of the purified RNA were reverse transcribed using random hexamers with the HighCapacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). RT conditions comprised an initial incubation step at 25°C for 10 min to allow random hexamers annealing, followed by cDNA synthesis at 37°C for 120 min, and a final inactivation step for 5 min at 95°C.

The levels of mRNA expression were measured by real-time quantitative PCR using the ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Specific primers (Applied Biosystems) used for these experiments were: Myf-5 (Assay ID: Rn01502778_m1), MyoD (Rn00598571_m1), myogenin (Rn00567418_m1), myostatin (Rn00569683_m1) and p21 (Rn01433386_m1). PCR conditions were 10 min at 95°C for enzyme activation, followed by 40 two-step cycles (15 s at 95°C, 1 min at 60°C). The levels of 18S mRNA expression were measured in all samples to normalize the gene expressions for sample-to-sample differences in RNA input, RNA quality, and reverse transcription efficiency. The threshold cycle (Ct) was determined, and the relative gene expression was expressed as follows: fold change $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Primers used for real-time PCR are shown in Table 1.

Immunoblot analysis

Aliquots of muscle lysate (50-120 µg of proteins) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibodies: anti-myf5 (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), anti-myoD (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-myogenin (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-myostatin (1:1000, Abcam, UK), anti-MnSOD (1:5000, Stressgen Biotechnologies Corp.), anti-catalase (1:5000, Sigma Aldrich, Missouri), anti-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling), anti-p21 (1:1000, Abcam) and α -actin (1:700, Sigma Aldrich). Thereafter, membranes were incubated with a secondary

antibody for 1 h at room temperature. Specific proteins were visualized by using the enhanced chemiluminescence procedure as specified by the manufacturer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Autoradiographic signals were assessed by using a scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA).

Statistics

Results are expressed as means \pm SDs. Normality of distribution was checked with the Kolmogorov test, and homogeneity of variance was tested by Levene's statistics. Data in young and aged rats were compared using Student's t test for unpaired data and differences were considered statistically significant for $P < 0.05$.

RESULTS

Aging induces oxidative stress and activates p38 MAP kinase in skeletal muscle

As shown in Figure 1, aging caused oxidative stress in skeletal muscle. Muscle XO activity of aged rats was approximately 50% higher than that of young animals (Panel A). Gastrocnemius of aged rats showed a glutathione redox ratio (GSSH/GSH) which was more than twofold higher than those of young rats (Panel B). We also determined the muscle protein oxidation. Proteins with a molecular mass of 25 kDa and 37 kDa were significantly more oxidized in gastrocnemius muscle of aged rats (Panel C). Catalase protein expression also increased in aged in skeletal muscle (Panel D). Skeletal muscle of aged rats displayed twofold higher phosphorylation of the redox-sensitive protein kinase p38 MAPK when compared to the young (Figure 2).

Aging caused an increase in MRF mRNA without change in MRF protein content

The results of MRF transcript expression analyses are presented in the Figure 3. Aging caused an increase in Myf-5, MyoD and myogenin mRNA expressions in gastrocnemius muscle (Panel A, C and E). However, the protein immunoblotting showed that the content of all these factors remains stable with age (Panel B, D and E).

Aging upregulates myostatin and p21 expression in skeletal muscle

Myostatin protein content in aged rats was approximately 75% higher than that of young animals but mRNA expression remained unchanged (Figure 4 Panel A and B). Aging is associated with higher p21 mRNA and protein content in gastrocnemius muscle (Figure 4 Panel C and D).

DISCUSSION

Age-related MRF mRNA upregulation is not associated to increases in MRF protein content: a role for myostatin?

As SC are essential for muscle fiber maintenance, growth and regeneration, an age-related decline in the number of SC (Renault et al. 2002; Kadi et al. 2004; Verdijk et al. 2007) and/or their inability to become activated and proliferate upon stimuli (Conboy et al. 2005; Carlson and Conboy 2007) constitute two potential mechanisms contributing to sarcopenia. In the present study, we focused on SC activity and more specifically on MRF activity. During the regenerative process the satellite cells (SC) activate and subsequently differentiate, and the induction of MRF is crucial for these processes (Le Grand and Rudnicki 2007). MyoD, Myf5 and myogenin possess defined specific roles in SC biology. Myf5 and MyoD regulate the formation of myoblasts from SC (Sabourin and Rudnicki 2000; Ustanina et al. 2007), whereas myogenin is necessary for the differentiation of myotubes and fibers from myoblasts (Sabourin and Rudnicki 2000). In the present study, we measured for the first time both mRNA and protein content of MRFs in aged skeletal muscle. In accordance with previous studies (Musaro et al. 1995; Alway et al. 2002; Bamman et al. 2004; Edstrom and Ulfhake 2005), we observed that Myf5, MyoD and myogenin mRNA increased in rat skeletal muscle. But on contrary to this MRF mRNA upregulation, we observed that all MRF protein content remain stable with aging demonstrating that MRF mRNA upregulation is inefficient to increase MRF protein content in aged skeletal muscle. Interestingly, the magnitude of upregulation of MRF mRNA expression appears to be proportional to the degree of sarcopenia (Edstrom and Ulfhake 2005) suggesting that aged skeletal muscle remains in a state of failing regenerative effort. Our results showed that a post-transcriptional mechanism might be responsible to impairments in MRF regulation, and so in SC activity.

As shown in Figure 4, we report that aging caused an overexpression of myostatin protein content in skeletal muscle. *In vitro* studies have provided substantial information concerning the role of myostatin in muscle regeneration. Thus in myostatin-overexpressing myoblasts, the formation of multinucleated myotubes was suppressed when incubated in a differentiation medium (Joulia et al. 2003). Myostatin overexpression has been also associated in C2C12 cells with a decrease in MyoD, myogenin and Myf5 protein levels, without any clear-cut influence on their mRNAs levels (Langley et al. 2002; Joulia et al. 2003) suggesting a posttranscriptional action. Moreover Joulia et al. (2003) especially observed that myostatin induced the decrease of the hyperphosphorylated form of MyoD, specifically addressed to the ubiquitin-degradation pathway (Song et al. 1998). Taken together, all these results suggest that myostatin overexpression in aged skeletal muscle could affect SC activity by stimulating MRF catabolism.

Role of ROS and myostatin in p21 expression in aged skeletal muscle

Inhibition of myoblasts proliferation are generally associated to up-regulation of p21 expression and concomitant downregulation of Cdk2 expression and activity resulting in hypophosphorylated retinoblastoma (Rb) and cell cycle arrest (Thomas et al. 2000). As shown in Figure 5, we observed that aging up-regulates p21 mRNA and protein content in skeletal muscle suggesting that age-related p21 upregulation could be involved in impairments of proliferative capacities of myoblasts in aged skeletal muscle. In parallel to increase in p21 expression, we report that myostatin protein content increased with age in skeletal muscle. Interestingly, previous *in vitro* studies showed that myostatin directly upregulated p21 expression (Thomas et al. 2000; Philip et al. 2005). However, the p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) appears to be an intermediate key-regulator for myostatin action on p21 (Philip et al. 2005) by increasing the stabilization of the p21 protein (Kim et al. 2002). In agreement with previous studies (Williamson et al. 2003; Mylabathula et al. 2006), we found that aging increased basal p38 phosphorylation state in skeletal muscle. Consequently, our results suggest that age-related myostatin increase may explain impairments in proliferative capacities of myoblasts with age by acting on p38 phosphorylation state and p21 expression. However, p38 MAPK could also drive age-related p21 upregulation independently from myostatin action. Indeed Kefaloyianni et al. (2006) demonstrated that p38 MAPK pathway is activated during oxidative stress in skeletal myoblasts. *In vivo* studies also showed that p38 MAPK is directly activated by reactive oxygen species (ROS) in many physiological stresses (Gomez-Cabrera et al. 2005). As shown in Figure 1, we observed that aged skeletal muscle is clearly exposed to a higher oxidative stress since XO activity, protein carbonylation, GSSG/GSH ratio and catalase protein content increased with age in skeletal muscle. Consequently, our results support that age-related oxidative stress could drive inhibition of myoblast proliferation following the pathway: ROS → p38 MAPK → p21.

Recent researches have demonstrated that impairments in regenerative capacity and proliferation of SC in aged skeletal muscle are not dependant on an age-related decrease in intrinsic potential of SC to support effective myogenesis (Carosio et al. 2009). The changes in the muscle microenvironment appear to be the main factors inhibiting satellite cells competences and increasing in tissue fibrosis in aged skeletal muscle (Le Grand and Rudnicki 2007; Carosio et al. 2009). Our results showed that myostatin and ROS could be these key-elements of aged muscle microenvironment by modulating MRF and p21 expression. Further investigations using antioxidant treatments and myostatin inhibitors in aged animals are required to confirm this hypothesis. Figure 5 shows a schematic representation highlighting the role of ROS and myostatin in the regulation of MRF and p21 in aged skeletal muscle.

REFERENCES

- Alway, SE, Degens, H, et al. (2002). Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (2), R411-422.
- Ardite, E, Barbera, JA, et al. (2004). Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol*, 165 (3), 719-728.
- Asensi, M, Sastre, J, et al. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem*, 217 (2), 323-328.
- Bamman, MM, Ragan, RC, et al. (2004). Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women. *J Appl Physiol*, 97 (4), 1329-1337.
- Beckman, JS, Parks, DA, et al. (1989). A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med*, 6 (6), 607-615.
- Carlson, BM and Faulkner, JA (1989). Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol*, 256 (6 Pt 1), C1262-1266.
- Carlson, ME and Conboy, IM (2007). Regulating the Notch pathway in embryonic, adult and old stem cells. *Curr Opin Pharmacol*, 7 (3), 303-309.
- Carosio, S, Berardinelli, MG, et al. (2009). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*,
- Combaret, L, Dardevet, D, et al. (2009). Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12 (1), 37-41.
- Conboy, IM, Conboy, MJ, et al. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433 (7027), 760-764.
- Cruz-Jentoft, AJ, Baeyens, JP, et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39 (4), 412-423.
- Doherty, TJ (2003). Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol*, 95 (4), 1717-1727.
- Edstrom, E and Ulfhake, B (2005). Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*, 4 (2), 65-77.
- Gallegly, JC, Turesky, NA, et al. (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol*, 97 (3), 1082-1090.
- Gomez-Cabrera, MC, Borrás, C, et al. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567 (Pt 1), 113-120.
- Hansen, JM, Klass, M, et al. (2007). A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle. *Cell Biol Int*, 31 (6), 546-553.
- Hopp, JF (1993). Effects of age and resistance training on skeletal muscle: a review. *Phys Ther*, 73 (6), 361-373.
- Joulia, D, Bernardi, H, et al. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*, 286 (2), 263-275.
- Kadi, F, Charifi, N, et al. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve*, 29 (1), 120-127.
- Kefaloyianni, E, Gaitanaki, C, et al. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 18 (12), 2238-2251.

- Kim, GY, Mercer, SE, et al. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem*, 277 (33), 29792-29802.
- Langley, B, Thomas, M, et al. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*, 277 (51), 49831-49840.
- Le Grand, F and Rudnicki, MA (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (6), 628-633.
- Lexell, J (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 50 Spec No 11-16.
- Marzetti, E, Lawler, JM, et al. (2008). Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 44 (2), 160-168.
- Musaro, A, Cusella De Angelis, MG, et al. (1995). Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. *Exp Cell Res*, 221 (1), 241-248.
- Mylabathula, DB, Rice, KM, et al. (2006). Age-associated changes in MAPK activation in fast- and slow-twitch skeletal muscle of the F344/NNiaHSD X Brown Norway/BiNia rat model. *Exp Gerontol*, 41 (2), 205-214.
- Philip, B, Lu, Z, et al. (2005). Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal*, 17 (3), 365-375.
- Renault, V, Thornell, LE, et al. (2002). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell*, 1 (2), 132-139.
- Sabourin, LA and Rudnicki, MA (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 57 (1), 16-25.
- Shefer, G, Van de Mark, DP, et al. (2006). Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*, 294 (1), 50-66.
- Song, A, Wang, Q, et al. (1998). Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol Cell Biol*, 18 (9), 4994-4999.
- Thomas, M, Langley, B, et al. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 275 (51), 40235-40243.
- Ustanina, S, Carvajal, J, et al. (2007). The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*, 25 (8), 2006-2016.
- Verdijk, LB, Koopman, R, et al. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 (1), E151-157.
- Welle, S, Bhatt, K, et al. (2002). Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp Gerontol*, 37 (6), 833-839.
- Williamson, D, Gallagher, P, et al. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol*, 547 (Pt 3), 977-987.

Table 1. Primer sequences used for real-time PCR

	Sense	Anti-sense
Myf5	5'- CAGCCAAGAGTAGCAGCCTTCG - 3'	3'- GTTCTTTCGGGACCAGACAGGG - 5'
MyoD	5'- CACACTTCCCCACTACGGTGC - 3'	3'- CACTGTAGTAGGCGGCGTCGTAG - 5'
Myogenin	5'- AGTGCCATCCAGTACATTGAGCG - 3'	3'- GGGTGGAATTAGAGGCGCATTA - 5'
p21	5'- CCCGTGGACAGTGAGCAGTT - 3'	3'- AGCAGGGCCGAGGAGGTA - 5'
Myostatin	5' - AGAGAGAGGCGAATGTGGAA - 3'	3' - TCACTGCTGTCATCCCTCTG - 5'
18S	5'- GTTGGTTTTTCGGAAGTGAAGC - 3'	3'- GTCGGCATCGTTTATGGTCG - 5'

Figure 1. Oxidative stress markers in skeletal muscle. Mean (\pm SD) results of GSSG/GSH ratio (A), protein carbonylation (B), XO activity (C) and catalase protein content (D) in the cytosolic fraction of gastrocnemius of young and aged rats (n = 12).

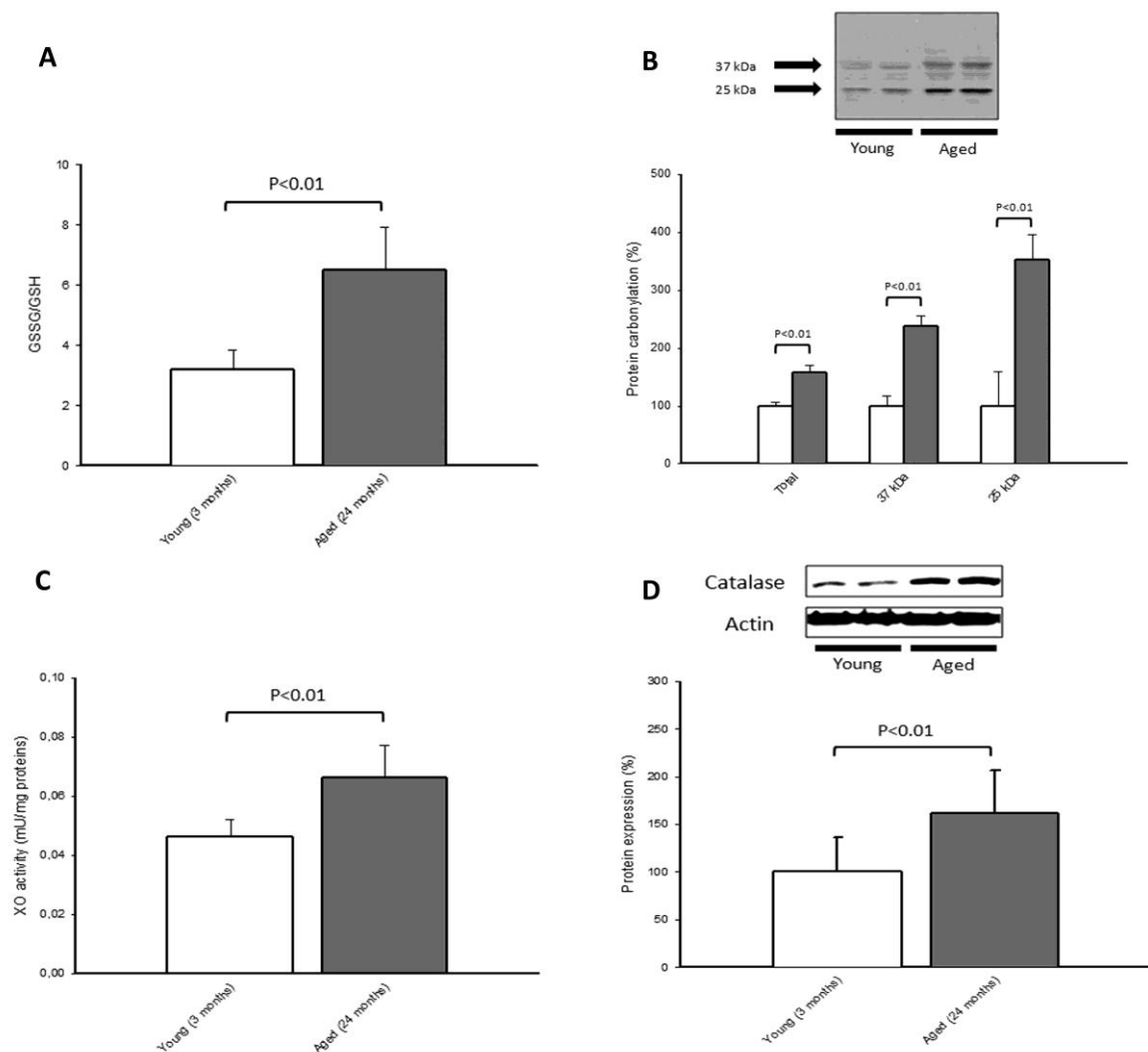


Figure 2. p38 MAPK is more phosphorylated in aged skeletal muscle. Mean (\pm SD) results of p38 activation in gastrocnemius of young and aged control rats (n = 12).

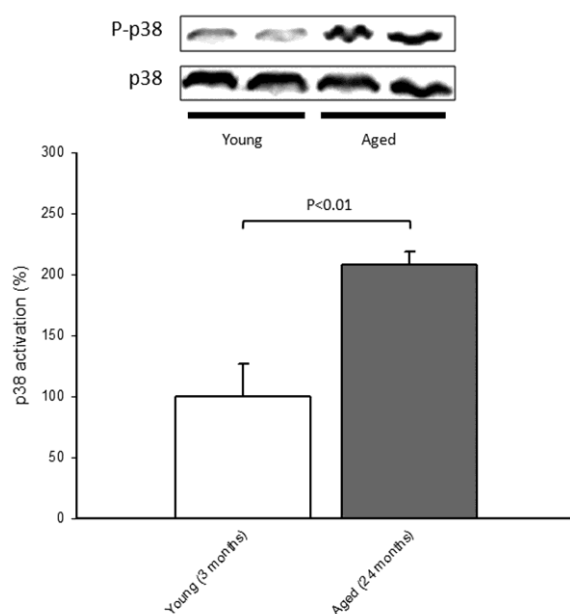


Figure 3. Aging caused MRF mRNA upregulation without change in protein content in skeletal muscle. Mean (\pm SD) results of Myf5 (A,B), myoD (C,D), myogenin (E,F) mRNA and protein content in gastrocnemius of young and aged rats (n = 12).

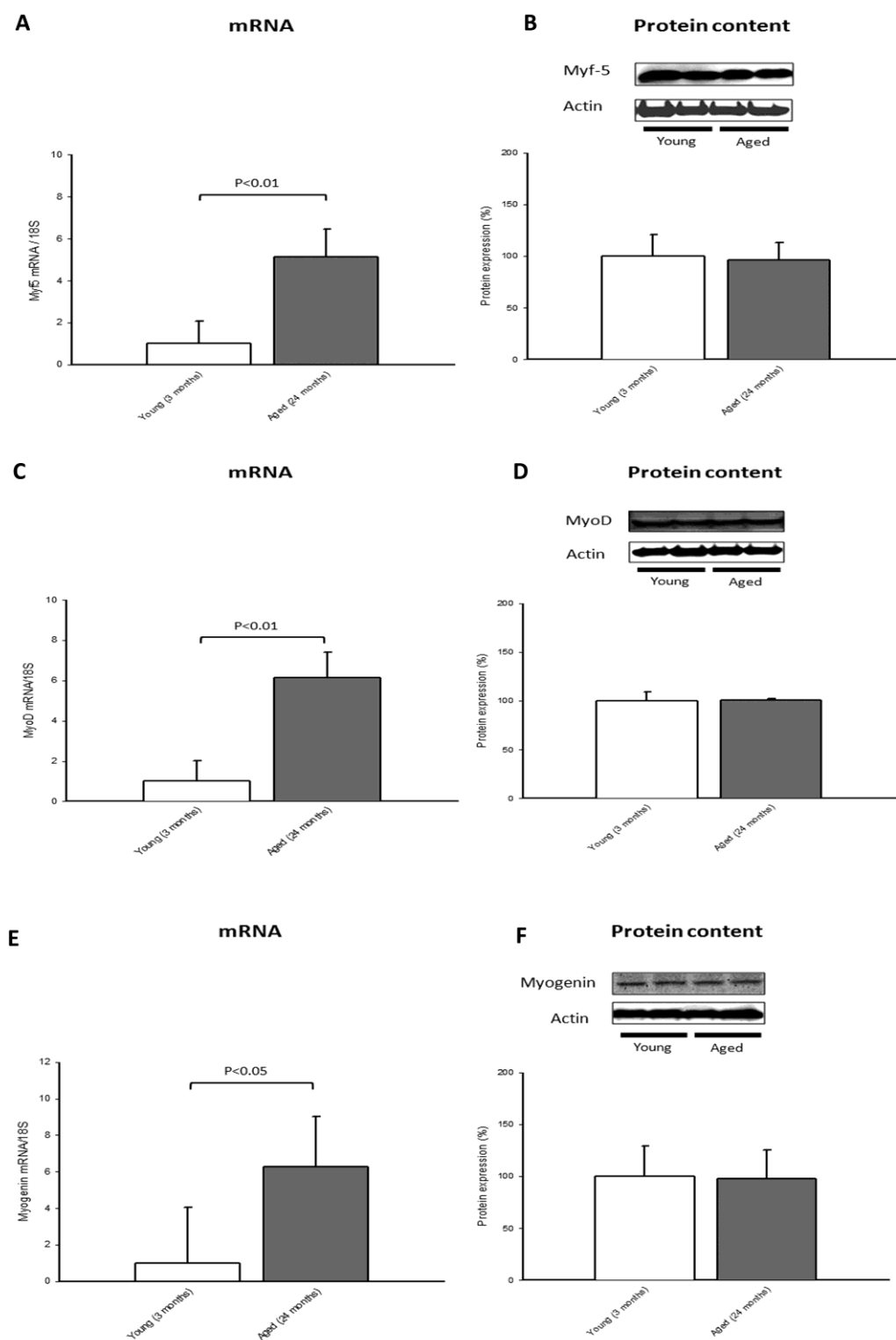


Figure 4. Aging increases myostatin and p21 expression in skeletal muscle. Mean (\pm SD) results of myostatin mRNA and protein content in gastrocnemius of young and aged rats (n = 12).

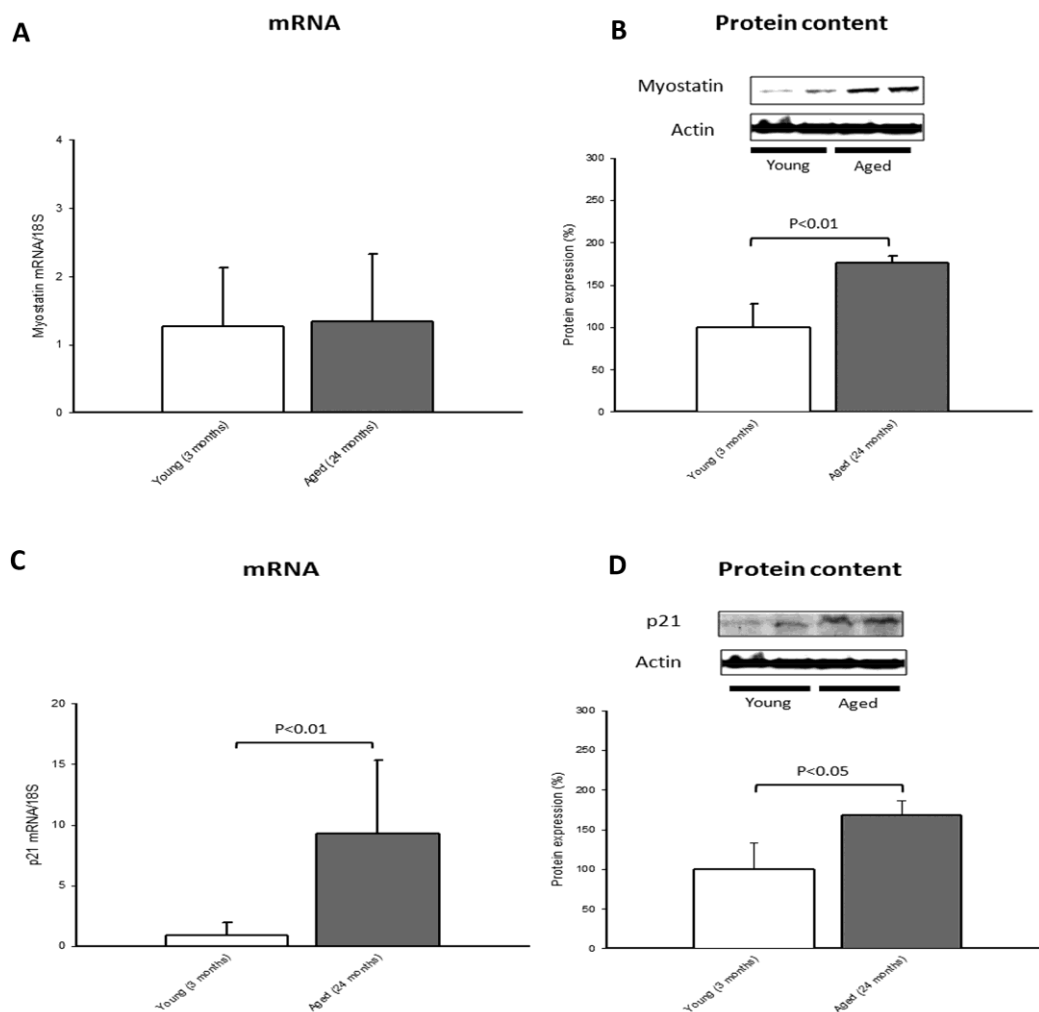
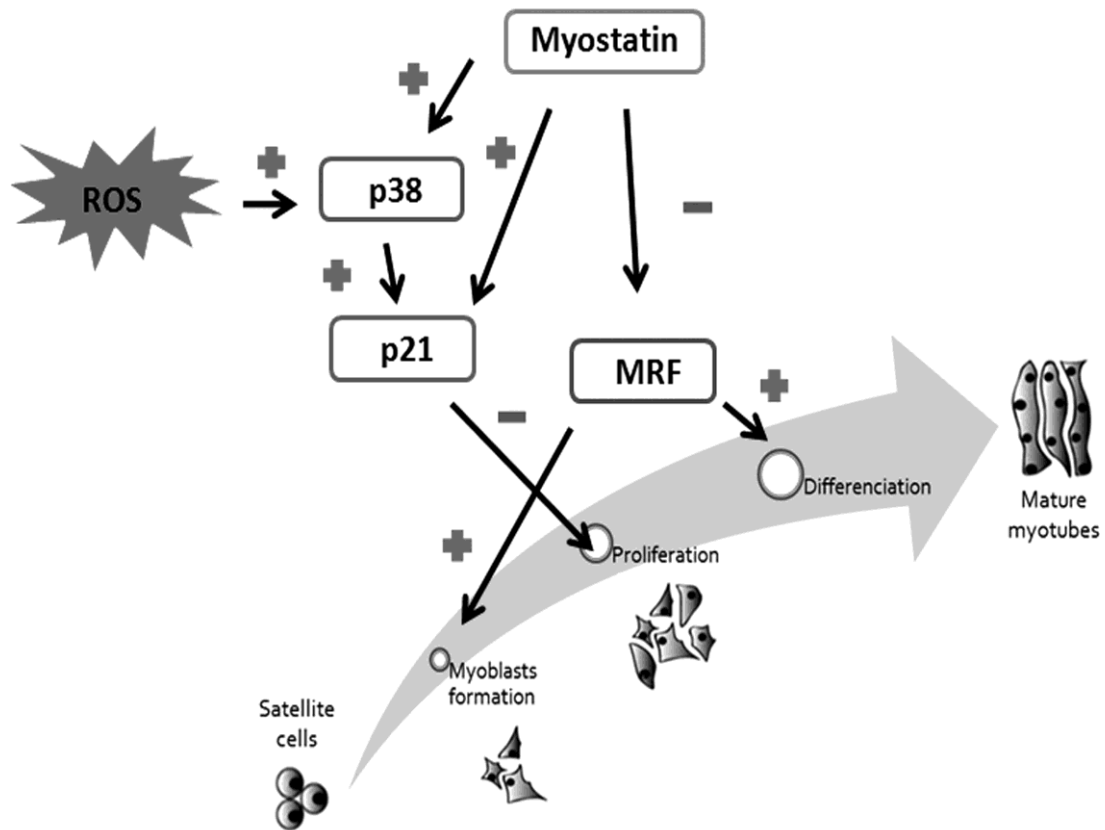


Figure 5. Proposed mechanism of the role of ROS and myostatin in the regulation of MRF and p21 in aged skeletal muscle. Plus signs (+) indicate upregulation/activation and negative signs (-) equate to downregulation of the protein(s).



Etude n°3 : L'âge altère la réactivité de PGC-1 α aux stimuli habituels et compromet la biogénèse mitochondriale en réponse à l'entraînement

RESUME FRANCAIS

INTRODUCTION

L'avance en âge est associé à une progressive diminution progressive de la masse et de la force musculaire (Iannuzzi-Sucich et al. 2002; Doherty 2003). Ce syndrome gériatrique, appelé sarcopénie (Rosenberg 1997), est également associé à des perturbations métaboliques comme la réduction du nombre de mitochondries et l'altération de leurs fonctions (Coggan et al. 1992; Chabi et al. 2008). Les mécanismes spécifiques conduisant aux modifications des capacités mitochondriales dans le tissu musculaire âgé sont encore mal connus. L'accumulation des dommages oxydatifs et l'exacerbation du phénomène d'apoptose semblent néanmoins grandement impliqués dans ces altérations (Bua et al. 2002; Chabi et al. 2008). Il est désormais reconnu que le peroxisome proliferator activated receptor-coactivator (PGC-1 α) joue un rôle central dans la régulation de la biogénèse mitochondriale (Puigserver and Spiegelman 2003; Hood et al. 2006). En s'appuyant sur des modèles transgéniques surexprimant PGC-1 α dans le muscle squelettique, il a été également montré que PGC-1 α prévenait en partie la sarcopénie en réduisant les activités apoptotiques, autophagiques et protéolytiques (Wenz et al. 2009). Ces travaux suggèrent donc que la modulation du contenu de PGC-1 α dans le tissu musculaire constituerait une stratégie efficace pour la prévention de certains mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la sarcopénie. Dans la mesure où l'entraînement en endurance est reconnu comme stimulant l'expression de PGC-1 α dans le tissu musculaire jeune (Gomez-Cabrera et al. 2008a), cette modalité d'exercice pourrait constituer une stratégie thérapeutique efficace pour limiter la sarcopénie. Par conséquent, notre étude a pour but de déterminer dans quelles mesures moduler l'expression de PGC-1 α par l'exercice physique peut constituer un moyen de stimuler la biogénèse mitochondriale dans le tissu musculaire de rats âgés.

Pour répondre à cet objectif, l'étude proposée :

- A comparé l'expression de PGC-1 α dans le muscle de rats âgés et dans le muscle de souris transgéniques n'exprimant pas ce facteur (KO- PGC-1 α)
- A testé l'activation de PGC-1 α en réponse à différents stimuli (le froid, l'injection d'hormone thyroïdienne T3, l'entraînement en endurance) chez des rats jeunes et âgés comparés à des souris KO- PGC-1 α
- Dans ces différents modèles, le contenu en cytochrome c a permis d'évaluer le nombre de mitochondries et l'expression de NRF1, facteur de transcription up-régulé par PGC-1 α a été utilisé comme index de stimulation de la biogénèse mitochondriale.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude s'est appuyée sur plusieurs modèles expérimentaux : des souris wildtype (n=14) et KO PGC-1 α (n=13) ainsi que des rats Wistar mâles jeunes (3 mois, n=24) et âgés (24 mois, n=24). Une partie des animaux (souris et rats) a été soumise à un entraînement en endurance de 4 semaines à une intensité d'environ 75% de $\dot{V}O_{2MAX}$. Une autre partie des rats jeunes et âgés ont été soumis à une exposition au froid (24h à 4°C) ou à une injection intrapéritonéale de T3 (0,4 mg/kg). Dans l'ensemble des expérimentations, les muscles soléaires ont été prélevés et congelés dans l'attente des analyses. Les détails du protocole expérimental ainsi que les analyses effectuées dans le cadre de cette étude figurent dans la partie Annexes (i.e. Fiches techniques n°1-6, 20-30).

RESULTATS

A la différence de ce qui est observé chez des souris exprimant PGC-1 α , l'entraînement en endurance ne stimule pas la biogenèse mitochondriale dans le muscle des souris KO- PGC-1 α , comme l'atteste l'absence d'augmentation du contenu en cytochrome c et de l'expression de NRF1. Chez les souris KO- PGC-1 α , la capacité d'endurance, jugée sur le temps d'épuisement lors d'une course sur tapis roulant, est peu améliorée par l'entraînement.

En réponse à l'entraînement en endurance, le comportement de rats âgés (mâles, Wistar, 24 mois) reproduit celui des souris KO- PGC-1 α . L'entraînement n'a pas d'effet sur l'expression de PGC-1 α , le contenu en cytochrome c et l'expression de NRF1, à la différence de ce qui est observé chez les rats jeunes (3 mois).

Il est reconnu que l'expression de PGC-1 α peut être également stimulée dans le muscle squelettique par une exposition prolongée au froid ou par l'hormone thyroïdienne (T3) (Puigserver et al. 1998; Irrcher et al. 2003). Cette étude confirme qu'une exposition de 24h à 4°C ou une injection de T3 (0.4 mg.kg⁻¹) stimule dans le tissu musculaire de rats jeunes l'expression de PGC-1 α et active la p38 MAPK, une kinase reconnue comme stimulant l'expression de PGC-1 α . Néanmoins, ces mêmes conditions ne modifient ni l'expression de PGC-1 α , ni l'activité de la p38 MAPK dans le tissu musculaire de rats âgés. La présence d'un stress oxydant chronique au sein du muscle âgé comme en témoigne un contenu supérieur en protéines carbonylées nous interroge quant au rôle du stress oxydant dans l'incapacité du muscle âgé à stimuler PGC-1 α .

CONCLUSION

Cette étude démontre que l'âge supprime la réactivité de PGC-1 α aux stimuli habituels (froid, hormone thyroïdienne, entraînement en endurance) et que cette altération joue un rôle majeur dans les dysfonctions mitochondriales. Elle suggère un rôle probable du stress oxydant chronique.

Il faut toutefois noter que l'avance en âge est systématiquement associée à une inactivité chronique prolongée, chez l'homme comme chez l'animal. C'est tout particulièrement vrai pour les modèles d'animaux élevés, comme les rongeurs, dans des cages interdisant toute activité physique, même minimale. En perspective, il convient donc de discuter des rôles respectifs de l'âge seul et de l'inactivité physique associée dans le stress oxydant chronique et les dysfonctions irréversibles qui en résultent.

Title: Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise

Running title: PGC-1 α and age-associated muscle dysfunction

Authors: Frederic Derbré^{1*}, Mari Carmen Gomez-Cabrera*, Ana L Nascimento, Fabian Sanchis-Gomar, Vladimir E Martinez- Bello, Jesus A.F. Tresguerres², Teresa Fuentes³, Arlette Gratas-Delamarche¹, Maria Monsalve⁴ and Jose Viña.

Department of Physiology. University of Valencia. Fundacion Investigacion Hospital Clinico Universitario/INCLIVA. Spain.

¹Laboratory “Movement Sport and health Sciences”, University Rennes. France

²Department of Physiology. University Complutense of Madrid. Spain

³Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria. Spain

⁴Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain

* These two authors have contributed equally to this work.

Jose Viña, Professor, MD (Corresponding author)

Department of Physiology. Faculty of Medicine. University of Valencia.

Av. Blasco Ibañez, 15, Valencia

46010 Spain

Phone: (34) 96 386 46 50

Fax: (34) 96 386 46 42

Email: jose.vina@uv.es

Key Words: Sarcopenia, exercise, oxidative stress, aging, cytochrome C, gene knockout

**AGE ASSOCIATED LOW MITOCHONDRIAL BIOGENESIS MAY BE EXPLAINED BY
LACK OF RESPONSE OF PGC-1 α TO EXERCISE**

ABSTRACT

Low mitochondriogenesis is critical to explain loss of muscle function in ageing and in the development of frailty. The aim of this work was to explain the mechanism by which mitochondriogenesis is decreased in aging and to determine to which extent it may be prevented by exercise. We used aged animals and compared them with PGC-1 α depleted ones (PGC-1 α KO).

PGC-1 α KO mice showed a significant decrease in the mitochondriogenic pathway in muscle. In aged rats we found a loss of exercise-induced expression of PGC-1 α , NRF-1 and of cytochrome C. Thus muscle mitochondriogenesis, which is activated in exercise in young rats and mice, is not in aged or PGC-1 α KO ones. Other stimuli to increase PGC-1 α synthesis apart from exercise, namely cold induction or thyroid hormone treatment, were effective in young rats but not in aged ones. To sum up the low mitochondrial biogenesis associated with ageing may be due to the lack of response of PGC-1 α to different stimuli. Old animals behave as PGC-1 α KO. Results reported here highlight the role of PGC-1 α in the loss of mitochondriogenesis associated with ageing and point to this important transcriptional co-activator as a target for pharmacological interventions to prevent age-associated sarcopenia.

INTRODUCTION

Recent advances in medical care as well as in basic Gerontology have led to a significant increase in longevity of populations (life span). However, the very significant increase in life span has also led to an important increase in frailty and dependency (Gill et al. 2002). It is clear now that we must aim at increasing health span. Muscle ageing is a key component of the increase in frailty in human and animal populations (Vanitallie 2003). Physical exercise is an obvious anti-ageing mechanism and it is intended to serve as a prevention of cardiovascular ageing but also as a prevention of sarcopenia as well as loss in muscle functionality (Fiatarone et al. 1994).

Early work by Miquel and co-workers proposed that loss of mitochondriogenesis was critical in the fundamental process of ageing (Miquel et al. 1980; Miquel 1992). Later, in the 90's, we reported that mitochondrial damage is an early event in cellular ageing (Sastre et al. 1996). This was independently confirmed by the group of Bruce Ames (Hagen et al. 1997). In 2003, it was shown in skeletal muscle that age causes a decrease in ATP content and production by approximately 50% in isolated rat mitochondria (Drew et al. 2003). Since the promotion of mitochondriogenesis is critical to prevent ageing, an obvious approach was to try and enhance it by physical exercise training (Holloszy and Booth 1976; Davies et al. 1982). Researches have identified the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) as the master regulator of mitochondriogenesis in mammalian tissues (Puigserver et al. 1998; Wu et al. 1999; Puigserver and Spiegelman 2003). *In vivo* and *in vitro* studies have shown that PGC-1 α levels stimulate mitochondrial proliferation in skeletal muscle (Hood et al. 2006). Increased PGC-1 α levels in skeletal muscle, by using transgenic MCK-PGC-1 α (PGC-1 α driven by a muscle creatine kinase promoter), prevents muscle wasting by reducing apoptosis, autophagy, and proteasome degradation (Wenz et al. 2009). Moreover in a recent study published by Henriette Pilegaard's group it has been shown that PGC-1 α is required for the beneficial effects of moderate exercise training at advanced age to maintain mitochondrial metabolic and antioxidant capacity (Leick et al. 2010b). These studies suggest that the modulation of PGC-1 α levels in skeletal muscle present an avenue for the prevention and treatment of age-related disorders.

The aim of our work was to explain the mechanism by which mitochondriogenesis is decreased in aging and to determine to which extent it may be prevented by exercise. As endurance training is known to up-regulate PGC-1 α expression in young skeletal muscle (Gomez-Cabrera et al. 2008a), modulation of PGC-1 α levels by endurance training in aged skeletal muscle may be a very effective strategy for the prevention and treatment of sarcopenia. For our purpose we used aged animals and compared them with PGC-1 α depleted ones.

Our results show that muscle from old animals presents a marked loss in mitochondriogenesis and that this may be due to a lack of induction of PGC-1 α (Puigserver et al. 1998). We find a striking similarity between the response to exercise training in PGC-1 α KO mice and in aged rats. In young

animals, PGC-1 α is activated in rat skeletal muscle not only by exercise training but also by cold exposure or triiodothyronine (T3). We report here that there is an age associated lack of expression of PGC-1 α in response to exercise training or to any of the other stimuli tested.

MATERIAL AND METHODS

Rats

For the exercise training experiments twenty four male Wistar rats were randomly divided into four experimental groups: young untrained (n=6), young trained (n=6), aged untrained (n=6) and aged trained (n=6). For the cold induction experiments sixteen male Wistar rats were randomly divided into four experimental groups: young control (n=4), young exposed to cold (n=4), aged control (n=4), aged exposed to cold (n=4). For the thyroid hormone experiments, sixteen male Wistar rats were randomly divided into four experimental groups: young control (n=4), young treated with T3 (n=4), aged control (n=4), aged treated with T3 (n=4). In all the experimental models the aged animals were 24 months old and the young ones were 3 months old. We chose 24 months old rats since previous studies have reported that sarcopenia is evident at this age in this specie (Hopp 1993).

Mice

The generation and phenotype of PGC-1 α KO mice have been described previously (Lin et al. 2004). The genotype of the offspring was assessed by determining the presence of either a WT- or KO-specific DNA fragment after extraction of DNA from a tail piece by the phenol-chloroform:isoamyl method, amplification of fragments by PCR using specific primers for both the WT and KO and separation on an agarose gel (Lin et al. 2004). Further analysis of the PGC-1 α expression revealed that its mRNA was absent in the skeletal muscle of the PGC-1 α KO animals. We also wanted to check the PGC-1 α protein levels in the skeletal muscle of the KO mice. For this purpose and in order to prevent unspecific cross-reactivity of PGC-1 α antibody in the PGC-1 α KO mice, we immunoprecipitated the samples of the KO and wild type (WT) mice (Fig.1 Panel A). Immunoprecipitation was performed with Dynabeads protein A (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The incubation of the antibody (anti-PGC-1 α , Cayman) with the beads and the incubation of the extract with antibody cross-linked to the beads, were both carried out overnight. The PGC-1 α IP fractions were then analyzed by Western Blotting. The band of PGC-1 α (~92 KDa) was clearly present in the skeletal muscle of the Wild Type animals and was absent in the skeletal muscle of the PGC-1 α KO mice. Although a faint band was present with a molecular weight over 100 KDa in the PGC-1 α KO muscles, taking into account its molecular weight, we do not consider that this band represents PGC-1 α . PGC-1 β is a very close homolog of PGC-1 α and shares extensive sequence identity (Lin et al. 2002). In addition to their similarities PGC-1 α and PGC-1 β

share common protein binding partners and the regulation of certain gene programs in skeletal muscle (Handschin et al. 2007). This is why we consider that this band could be PGC-1 β . However and to further test the effect of PGC-1 α deletion on muscle structure we performed an electron microscopy analysis of soleus muscle from WT and PGC-1 α KO animals. Soleus muscle was dissected and fixed overnight in 2% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde, and 0.08% sodium cacodylate buffer. The tissues were postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol, embedded in Poly Bed plastic resin, and sectioned for electron microscopy.

Twenty seven male mice (14 Wild-type and 13 PGC-1 α KO) were randomly divided into four experimental groups: WT untrained (n=6), WT trained (n=8), KO untrained (n=7) and KO trained (n=6). The animals were kindly provided from the Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC, Madrid, Spain). The animals were 5-6 months old at the beginning of the experimental protocol.

All animals were fed an ad libitum laboratory diet (Global diet 2014I; Harlan Teklad, Madison, WI) and were maintained at 23°C under a light/dark cycle of 12 h/12 h. The experimental protocol was approved by the Committee on Ethics in Research of the Faculty of Medicine of the University of Valencia.

Training protocols

Endurance-trained young and aged rats were exercised 5 d/wk on an animal treadmill (Model 1050 LS Exer3/6; Columbus Instruments, Columbus, OH) at a relative intensity of 75% VO_{2max} . The treadmill grade and velocity for each experimental group were chosen based on previous studies performed in young and aged rats (Patch and Brooks 1980; Lawler et al. 1993; Powers et al. 1994). During all the experiments, the grade of treadmill corresponded to 15% for young rats and 5% for aged rats. We followed a modification of the protocol of Davies et al. (Davies et al. 1981). The young animals were required to run, the first training session, for 25 minutes at a speed of 26.8 m*min⁻¹. The old animals were required to run, the first training session, at a speed of 15 m*min⁻¹ for 15 minutes. The duration and intensity of each work period was increased progressively. The last day of week 3 young animals were running for 1 hour at a speed of 30 m*min⁻¹ and the aged ones were running for 45 minutes at a speed of 18 m*min⁻¹. It has been shown that young untrained rats can sustain approximately 75% of their VO_{2max} to run at 26.8 m*min⁻¹ (15% grade) on a treadmill (Patch and Brooks 1980) (Davies et al. 1981). Aged untrained animals can sustain approximately 75% of their VO_{2max} to run at 15 m*min⁻¹ (5% grade) on a treadmill (Lawler et al. 1993). Exercise motivation was provided for all rodents by means of an electronic shock grid at the treadmill rear. However the electric shock was used sparingly during training and during the endurance capacity test. The untrained groups were exercised at the same speeds for only 10 minutes every 3 days for the entire 3 weeks period. Endurance capacity was

assessed, before and after the training period, during a run to exhaustion at $26.8 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ at a grade of 15% for young rats and at $15 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ at a grade of 5% for aged rats (Davies et al. 1982) (See Table 1a).

PGC-1 α KO and WT male mice were randomly allocated to either a training group or a control group. The training groups completed 4 weeks of treadmill exercise training 5 times per week and progressively increased until 60 minutes at $20 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ (10% slope) at the end of the second week. Endurance capacity was assessed, before and after the training period, during a run to exhaustion at $20 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ at a grade of 10% (See Table 1b). After the tests the animals were given 48h of complete rest before sacrifice.

Cold exposure protocol

After an acclimatization period (1 week), young and aged Wistar male rats were randomly divided into two groups: cold-exposed animals ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 24h) and control animals ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) (Puigserver et al. 1998). Skeletal muscles were removed immediately after the end of the cold exposure.

T3 treatment

Young and aged Wistar male rats were injected intraperitoneally one dose with either T3 ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) or vehicle (0.9% NaCl-propylene glycol; 40:60 vol/vol). Skeletal muscles were removed 6h after the injections (Irrcher et al. 2003). Gastrocnemius and soleus muscles were removed quickly, freeze-clamped immediately and stored at -80°C . All the animals were killed by an overdose of sodium pentobarbital.

SDS-PAGE and Western Blotting

Skeletal muscles were homogenized on ice in lysis buffer [10 mM Tris-pH 7.4, Sucrose 0.25M, 50mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM Sodium Pyrophosphate, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 100 μM Sodium orthovanadate, 50 mM Sodium fluoride] supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For the mice, the whole gastrocnemius was used to ensure homogeneity. Lysates were prepared from the homogenates by centrifugation for 15 min at 15,000 g and 4°C . Aliquots of muscle lysates were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies: anti-PGC-1 α (1:1000, Cayman), anti-NRF-1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-cytochrome C (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-phospho-NF- κB p65 (1:1000, Cell Signaling), anti-p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling) and anti- α -actin (1:700, Sigma Aldrich). Thereafter, membranes were incubated with a secondary antibody for 1 hour at room temperature. Specific proteins were visualized by using the enhanced chemiluminescence procedure as specified by the manufacturer (Amersham Biosciences, Piscataway,

NJ). Autoradiographic signals were assessed by using a scanning densitometer (BioRad, Hercules, CA).

Protein carbonylation

Oxidative modification of total proteins was assessed by immunoblot detection of protein carbonyl groups using the 'OxyBlot' protein oxidation kit (InterGen) as previously described (Romagnoli et al. 2010).

Statistics

Results are expressed as mean \pm S.D. Normality of distribution was checked with the Kolmogorov test, and homogeneity of variance was tested by Levene's statistics. For endurance capacity, a repeated-measures 2-factor analysis of variance was performed. Repeated measures were performed for training (before training compared with after training); the second factor was the status of animals (control or trained). The main effect of training was tested with Newman-Keul's post hoc test. For Western Blot analysis, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post hoc test (Sigma Stats, version 3.11). Results were considered statistically significant for $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of aging or PGC-1 α deletion on endurance response to training

Running time to exhaustion during an endurance capacity test was approximately ~63% lower in aged than in young animals (Table 1a). Similarly, running time to exhaustion was ~65-70% lower in the PGC-1 α KO mice than in WT animals (Table 1b). These results are in accordance with previous studies demonstrating that endurance capacity was lower in PGC-1 α KO animals than in WT (Leick et al. 2008a). Table 1a also shows that the intensity and duration of the training regimen followed by young and aged rats was enough to induce a significant improvement in maximal endurance capacity (~200% and ~135%, respectively). Similarly, the training protocol induced an increase in the endurance capacity both in WT and PGC-1 α KO mice (~284% and ~173%, respectively) (Table 1b).

Muscle mitochondriogenesis in PGC-1 α KO and aged animals

Figure 1 shows that muscle mitochondriogenesis is considerably impaired in PGC-1 α deficient mice. Panel a) shows that training caused an increase in PGC-1 α content in WT mice. As expected we did not find any PGC-1 α protein levels in sedentary or in trained PGC-1 α KO animals. Although the band corresponding to the PGC-1 α protein was absent in our KO mice (92 kDa), a faint band appeared in the Western Blotting over 100 kDa (See Material and Methods section).

Figure 1 (Panel b) shows that training increased NRF-1, a critical intermediate of the mitochondriogenic pathway, in WT animals but not in PGC-1 α KO ones. It is also shown that

sedentary PGC-1 α KO animals have considerably less NRF-1 than controls. Mitochondrial content can be measured directly, using morphometric estimates of organelle volume in relation to total cellular volume. More commonly, it is estimated by the change in maximal activity, measured under optimal conditions *in vitro*, of a typical “marker enzyme” such as citrate synthase, or by the change in content of a single protein-like cytochrome C (Terjung 1979; Hood 2001). In several recent manuscripts in which the effect of exercise training in mitochondrial biogenesis has been studied, cytochrome C has been used as a marker of mitochondrial mass/density in skeletal muscle (Hood et al. 2006; Leick et al. 2008b; Leick et al. 2010b). In our study the mitochondrial content was estimated measuring cytochrome C protein levels in skeletal muscle (Gomez-Cabrera et al. 2008a). Training caused an increase in cytochrome C content in WT but not in PGC-1 α KO mice. Cytochrome C content in PGC-1 α KO animals was also lower than in WT (Panel c). To sum up, deficiency in PGC-1 α resulted in a hampered mitochondriogenic responsiveness to exercise training. In aged rats we found very similar results, i.e. a loss of exercise training-induced stimulation of PGC-1 α , NRF-1 and protein expression of cytochrome C (Panels d, e and f). The main idea reported here is that old age resembles PGC-1 α deficiency in terms of lack of responsiveness to training. Indeed, young animals showed an increase in PGC-1 α after training which did not occur in aged ones (Fig.1 Panel d). In Panel e we show that NRF-1 was increased in muscle of young rats after training. This effect was lost when we studied aged animals. Finally Panel f shows that training increased cytochrome C content in muscle of young rats but again this effect was also lost in aged rats.

Oxidative stress and training in aged animals and PGC-1 α KO

As apparent from Fig. 1, many of the adaptations of the skeletal muscle to exercise training in ageing are similar to those found in PGC-1 α KO animals. Thus we measured the effect of exercise training on skeletal muscle protein oxidation status in young and aged animals and in WT and PGC-1 α KO animals. In Figure 2, we show protein oxidation in PGC-1 α KO (Panel a) and in aged animals (Panel b). PGC-1 α KO animals show an increase in resting protein oxidation (Panel a). The same happens in aged animals (panel b). No effects of training were found in any experimental group.

Lack of stimulation of PGC-1 α protein expression by cold exposure or by thyroid hormone treatment in the aged animal

The experiments reported above showing that the muscle of aged animals did not up-regulate the expression of PGC-1 α in response to exercise training, led us to think that ageing could result in a lack of responsiveness of PGC-1 α to other physiological stimuli. Two of the key stimulators of PGC-1 α are thyroid hormones (Irrcher et al. 2003) and cold exposure (Puigserver et al. 1998). Figure 3 (Panel a) shows that young animals, when exposed to cold, up-regulated the expression of PGC-1 α threefold but aged animals did not. The same happens with triiodothyronine (T3) (Panel a).

p38 activation is lost with ageing

p38 is an upstream regulator of PGC-1 α (McCarty et al. 2009). We reasoned that the lack of activation of PGC-1 α with ageing could be due to the lack of p38 activation. We thus tested the effect of cold induction and of T3 treatment on p38 phosphorylation and found that cold induction activates P38 in young animals (see Fig. 3, Panel c) but it fails to activate it in aged ones. In a similar fashion, treatment with T3 resulted in an increase in p38 phosphorylation in young animals, but not in aged ones. Figure 3 (Panels c and d) also indicates that aged animals show a hyper phosphorylation of p38 in the basal state. Since p38 is a master sensor of oxidative stress (Dolado et al. 2007) it makes sense that it is activated in aged animals because they are subjected to chronic oxidative stress (Harman 1956b).

DISCUSSION

The major idea in this paper is that ageing causes a lack of response of PGC-1 α to various stimuli, the most important being exercise training (see Fig. 1), but also to cold exposure or thyroid hormone treatment (see Fig. 3).

The role of mitochondria as key generator of oxidative stress and also target of the damage associated with reactive oxygen species (ROS) production was postulated by Miquel in the 70's (Johnson et al. 1975). Independent work from our laboratory (Sastre et al. 1996) and that from Bruce Ames' (Hagen et al. 1997) using both metabolic and flow cytometric approaches provided such evidence. We showed that mitochondria are damaged within cells instead of being frail and damaged during the isolation procedure. A functional muscle that has not lost the capacity to synthesise healthy mitochondria is an important contributor to the prevention of frailty, a major problem in medicine, particularly in geriatrics (Fiatarone et al. 1994; Gill et al. 2010). Thus, understanding the molecular mechanisms of mitochondriogenesis in ageing has both theoretical and practical importance. It has been reported that the mitochondrial function is adapted in response to calorie restriction and this adaptation is critically involved in lifespan extension (Anderson et al. 2008). Calorie restriction has been shown to activate PGC-1 α (Nisoli et al. 2005; Anderson et al. 2008; Anderson and Weindruch 2009) and it may be an effective strategy in delaying aging-induced cellular phenotypes in skeletal muscle (McKiernan et al. 2010). PGC-1 α is critical for the adaptation of muscle mitochondriogenesis to exercise which activates the expression of NRF-1 which in turn, activates TFAM, a factor required for the duplication of mitochondrial DNA (Hood 2001). This led us to think that mitochondriogenesis might be impaired in aging because of a lack of response of PGC-1 α in old animals when compared with young ones. To understand the role of the redox sensitive PGC-1 α in the regulation of mitochondriogenesis in muscle, we used animals which were depleted of PGC-1 α .

We found a striking similarity in the molecular response of exercise training in the mitochondriogenic pathway in animals which are depleted of PGC-1 α and in the old ones. The whole pathway involving PGC-1 α \rightarrow NRF-1 and finally cytochrome C (an indicator of mitochondrial mass) responded positively to exercise training in young animals, but failed to do so in old ones. This was precisely the same behaviour as that in PGC-1 α depleted animals

It could be argued that the intensity of the exercise training was not enough to onset the mitochondrial biogenesis in PGC-1 α KO animals or in old ones. However Table 1 shows that the intensity and duration of the training regimen followed by our animals was enough to induce a significant improvement in maximal endurance capacity.

PGC-1 α protects against skeletal muscle atrophy (Sandri et al. 2006) and very recently it has been shown to be required for training-induced prevention of age associated decline in mitochondria (Leick et al. 2010b). Moreover relevance of PGC-1 α in sarcopenia and metabolic diseases during aging has been also suggested (Wenz et al. 2009). Transgenic MCK-PGC-1 α animals have preserved mitochondrial function, neuromuscular junctions, and muscle integrity during aging. Moreover increased PGC-1 α levels in skeletal muscle prevents muscle wasting by reducing apoptosis, autophagy, and proteasome degradation (Wenz et al. 2009).

Our studies in exercise training adaptations to ageing, as stated above, led us to the conclusion that PGC-1 α was not responding to exercise training in old animals. We suspected that PGC-1 α expression might not be stimulated by any kind of stimulus in old animals. As numerous studies have showed in the last decade, the activation of PGC-1 α in response to exercise is mediated by a number of factors including ROS (Kang et al. 2009), AMP-activated protein kinase (AMPK) (Reznick et al. 2007), Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII) (Wright et al. 2007b) and p38 MAPK (Akimoto et al. 2005). Recent works in aged skeletal muscle suggest that the activation of transcription factors involved in mitochondriogenesis in response to exercise is blunted in aged skeletal muscle. In fact Reznick et al. (2007) have demonstrated that an acute exercise in aged rats fails to induce an activation of AMPK in skeletal muscle whereas an increase was observed in their young counterparts. On the other hand, Ljubijic et al. (2009) observed that CaMKII activation to acute contractile activity was blunted in aged skeletal muscle. Finally, Williamson et al. (2003) reported that an acute resistance exercise provided opposite responses depending on age with an increase p38 MAPK phosphorylation state in young skeletal muscle but a decrease in aged skeletal muscle. Based on these previous works, we suspected that PGC-1 α might not be reactive to any kind of stimulus in skeletal muscle of aged animals. To test this hypothesis we used two well-known stimuli of PGC-1 α in young and old animals, namely thyroid hormone stimulation and cold acclimation (Puigserver et al. 1998; Irrcher et al. 2003). Figure 3 shows that both T3 treatment or cold acclimatization caused a very pronounced activation of PGC-1 α in young animals. However, there was a striking lack of activation of PGC-1 α by any of the

stimuli tested when we were using old animals. Similarly, we found that both T3 treatment and cold acclimatization caused a concomitant activation of p38 MAPK in young skeletal muscle without any change in aged animals. Age-associated p38 MAPK chronic activation state could explain this lack of reactivity in skeletal muscle, and so in PGC-1 α reactivity.

It has been reported that the health benefits of chronic exercise may be, at least partially, due to a reduction in mitochondrial oxidant production (Judge et al. 2005). These data question the very well established idea that exercise generates free radicals. This was first established by the group of Packer (Davies et al. 1982) who showed that ROS are generated during muscle contraction. In that seminal paper, the authors already postulated that the exercise-induced mitochondriogenesis might be stimulated by ROS (Davies et al. 1982). We provided the first clear-cut evidence that exercise generates oxidative stress only when it is exhaustive (Sastre et al. 1992; Gomez-Cabrera et al. 2003). However physical exercise can be considered as a double edge sword: when practiced strenuously it causes oxidative stress and cell damage but when practiced with moderation, it increases the expression of antioxidant enzymes and thus should be considered as an antioxidant (Gomez-Cabrera et al. 2008b). In our study we have measured the effect of exercise training on skeletal muscle protein oxidation status in young and aged animals and in WT and PGC-1 α KO animals. We have found that skeletal muscle from aged and KO PGC-1 α animals exhibit oxidative stress i.e. an increase in protein carbonylation, in resting conditions. The protein oxidation was not significantly increased after training in any experimental group which is in accordance with our idea that exercise training does not increase oxidative stress (Gomez-Cabrera et al. 2008b). Previous works from our laboratory and others have demonstrated that interfering with free radical production with antioxidants may hamper mitochondriogenic activation by exercise training (Gomez-Cabrera et al. 2008a; Ristow et al. 2009; Strobel et al. 2010). In the case of ageing, we outline a different scenario. Our data show that there are chronic high levels of ROS in the skeletal muscle of old and PGC-1 α KO animals. We consider that under these circumstances the response to exercise of the redox-sensitive cell signalling pathways may be hampered. However this hypothesis needs to be confirmed in future investigations.

PGC-1 α is currently identified as a new therapeutic target for treatment of age-related mitochondrial dysfunction in skeletal muscle, and more generally for sarcopenia (Sandri et al. 2006). Moreover, recently an interesting paper has underpinned the critical role of PGC-1 α to link nuclear and mitochondrial changes in aging (Kelly 2011). Our study highlights the importance of maintaining a normal PGC-1 α responsiveness (which we show here is lost in ageing) in order to maintain normal muscle function, and certainly this problem deserves more research. A schematic interpretation of our results is in Figure 4.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grants: BFU 2007-65803/BFI (co-financed by FEDER Funds) and DPS2008-06968 to J.V. and by grants (ISCIII2006-RED13-027) from the “Red Temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF) (co-financed by FEDER Funds). Instituto de Salud Carlos III” and COST B35 Action.

REFERENCES

- Akimoto, T, Pohnert, SC, et al. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*, 280 (20), 19587-19593.
- Anderson, RM, Barger, JL, et al. (2008). Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*, 7 (1), 101-111.
- Anderson, RM and Weindruch, R (2009). Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab*, 21 (3), 134-141.
- Davies, KJ, Packer, L, et al. (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys*, 209 (2), 539-554.
- Davies, KJ, Quintanilha, AT, et al. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107 (4), 1198-1205.
- Dolado, I, Swat, A, et al. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11 (2), 191-205.
- Drew, B, Phaneuf, S, et al. (2003). Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (2), R474-480.
- Fiatarone, MA, O'Neill, EF, et al. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*, 330 (25), 1769-1775.
- Gill, TM, Baker, DI, et al. (2002). A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home. *N Engl J Med*, 347 (14), 1068-1074.
- Gill, TM, Gahbauer, EA, et al. (2010). Trajectories of disability in the last year of life. *N Engl J Med*, 362 (13), 1173-1180.
- Gomez-Cabrera, MC, Domenech, E, et al. (2008a). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, 87 (1), 142-149.
- Gomez-Cabrera, MC, Domenech, E, et al. (2008b). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44 (2), 126-131.
- Gomez-Cabrera, MC, Pallardo, FV, et al. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Jama*, 289 (19), 2503-2504.
- Hagen, TM, Yowe, DL, et al. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (7), 3064-3069.
- Handschin, C, Chin, S, et al. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*, 282 (41), 30014-30021.
- Harman, D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 11 298-300.
-

- Holloszy, JO and Booth, FW (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol*, 38 273-291.
- Hood, DA (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 90 (3), 1137-1157.
- Hood, DA, Irrcher, I, et al. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol*, 209 (Pt 12), 2265-2275.
- Hopp, JF (1993). Effects of age and resistance training on skeletal muscle: a review. *Phys Ther*, 73 (6), 361-373.
- Irrcher, I, Adhihetty, PJ, et al. (2003). PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (6), C1669-1677.
- Johnson, JE, Mehler, WR, et al. (1975). A fine structural study of degenerative changes in the dorsal column nuclei of aging mice. Lack of protection by vitamin E. *J Gerontol*, 30 (4), 395-411.
- Judge, S, Jang, YM, et al. (2005). Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289 (6), R1564-1572.
- Kang, C, O'Moore, KM, et al. (2009). Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med*, 47 (10), 1394-1400.
- Kelly, DP (2011). Cell Biology: Ageing theories unified. *Nature* 470 342-343.
- Lawler, JM, Powers, SK, et al. (1993). Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am J Physiol*, 265 (6 Pt 2), R1344-1350.
- Leick, L, Lyngby, SS, et al. (2010). PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 45 (5), 336-342.
- Leick, L, Wojtaszewski, JF, et al. (2008a). PGC-1{alpha} is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2), E463-474.
- Leick, L, Wojtaszewski, JF, et al. (2008b). PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2), E463-474.
- Lin, J, Puigserver, P, et al. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*, 277 (3), 1645-1648.
- Lin, J, Wu, PH, et al. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*, 119 (1), 121-135.
- Ljubcic, V and Hood, DA (2009). Diminished contraction-induced intracellular signaling towards mitochondrial biogenesis in aged skeletal muscle. *Aging Cell*, 8 (4), 394-404.
- McCarty, MF, Barroso-Aranda, J, et al. (2009). The "rejuvenatory" impact of lipoic acid on mitochondrial function in aging rats may reflect induction and activation of PPAR-gamma coactivator-1alpha. *Med Hypotheses*, 72 (1), 29-33.
- McKiernan, SH, Colman, RJ, et al. (2010). Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 46 (1), 23-29.
- Miquel, J (1992). An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res*, 275 (3-6), 209-216.
- Miquel, J, Economos, AC, et al. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 15 (6), 575-591.

- Nisoli, E, Tonello, C, et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310 (5746), 314-317.
- Patch, LD and Brooks, GA (1980). Effects of training on VO₂ max and VO₂ during two running intensities in rats. *Pflugers Arch*, 386 (3), 215-219.
- Powers, SK, Criswell, D, et al. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266 (2 Pt 2), R375-380.
- Puigserver, P and Spiegelman, BM (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, 24 (1), 78-90.
- Puigserver, P, Wu, Z, et al. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92 (6), 829-839.
- Reznick, RM, Zong, H, et al. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*, 5 (2), 151-156.
- Ristow, M, Zarse, K, et al. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (21), 8665-8670.
- Romagnoli, M, Gomez-Cabrera, MC, et al. (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 49 (2), 171-177.
- Sandri, M, Lin, J, et al. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (44), 16260-16265.
- Sastre, J, Asensi, M, et al. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, 263 (5 Pt 2), R992-995.
- Sastre, J, Pallardo, FV, et al. (1996). Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*, 24 (5), 1199-1205.
- Strobel, NA, Peake, JM, et al. (2010). Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis. *Med Sci Sports Exerc*,
- Terjung, RL (1979). The turnover of cytochrome c in different skeletal-muscle fibre types of the rat. *Biochem J*, 178 (3), 569-574.
- Vanitallie, TB (2003). Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. *Metabolism*, 52 (10 Suppl 2), 22-26.
- Wenz, T, Rossi, SG, et al. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (48), 20405-20410.
- Williamson, D, Gallagher, P, et al. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol*, 547 (Pt 3), 977-987.
- Wright, DC, Han, DH, et al. (2007). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem*, 282 (1), 194-199.
- Wu, Z, Puigserver, P, et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98 (1), 115-124.

Table 1. Training-induced improvement in maximal endurance time in PGC-1 α KO and aged animals. (A) Means (\pm SD) results of maximal endurance time before and after endurance training in young and aged rats (n=24) *P < 0.05 when compared to values before training. \$ P < 0.05 when compared to untrained groups. (B) Means (\pm SD) results of maximal endurance time before and after endurance training in wild type and PGC-1 α KO mice (n=27).* p<0.05 when compared to values before training. \$ p<0.05 when compared to the untrained group. & p<0.05 when compared to the KO mice trained group

(A)

Endurance capacity (min)	Young rats		Aged rats	
	Untrained	Trained	Untrained	Trained
Before	36.8 \pm 4.6	42.0 \pm 12.1	13.2 \pm 4.8	14.7 \pm 5.8
After 3 weeks	38.5 \pm 4.0	115.7 \pm 18.2* ^{\$}	19.7 \pm 7.5	46.3 \pm 6.5* ^{\$}

(B)

Endurance capacity (min)	Wild type mice		PGC-1 α KO mice	
	Untrained	Trained	Untrained	Trained
Before	37.0 \pm 24.5	39.3 \pm 26.2	12.0 \pm 6.9	13.2 \pm 8.8
After 4 weeks	41.3 \pm 27.8	158.8 \pm 53.3* ^{&\$}	21.2 \pm 3.6	58.0 \pm 16.4* ^{\$}

Figure 1. Exercise-induced activation of the mitochondrial biogenesis pathway in skeletal muscle. Western blotting analysis to detect PGC-1 α (a and d), NRF-1 (b and e) and cytochrome C (c and f) in PGC-1 α KO (n=27) and aged animals (n=24). Representative blots are shown. For the densitometric analysis of the results values are shown as mean (\pm SD). The content of α -actin, a house-keeping protein marker in skeletal muscle, was determined in all the experimental groups.

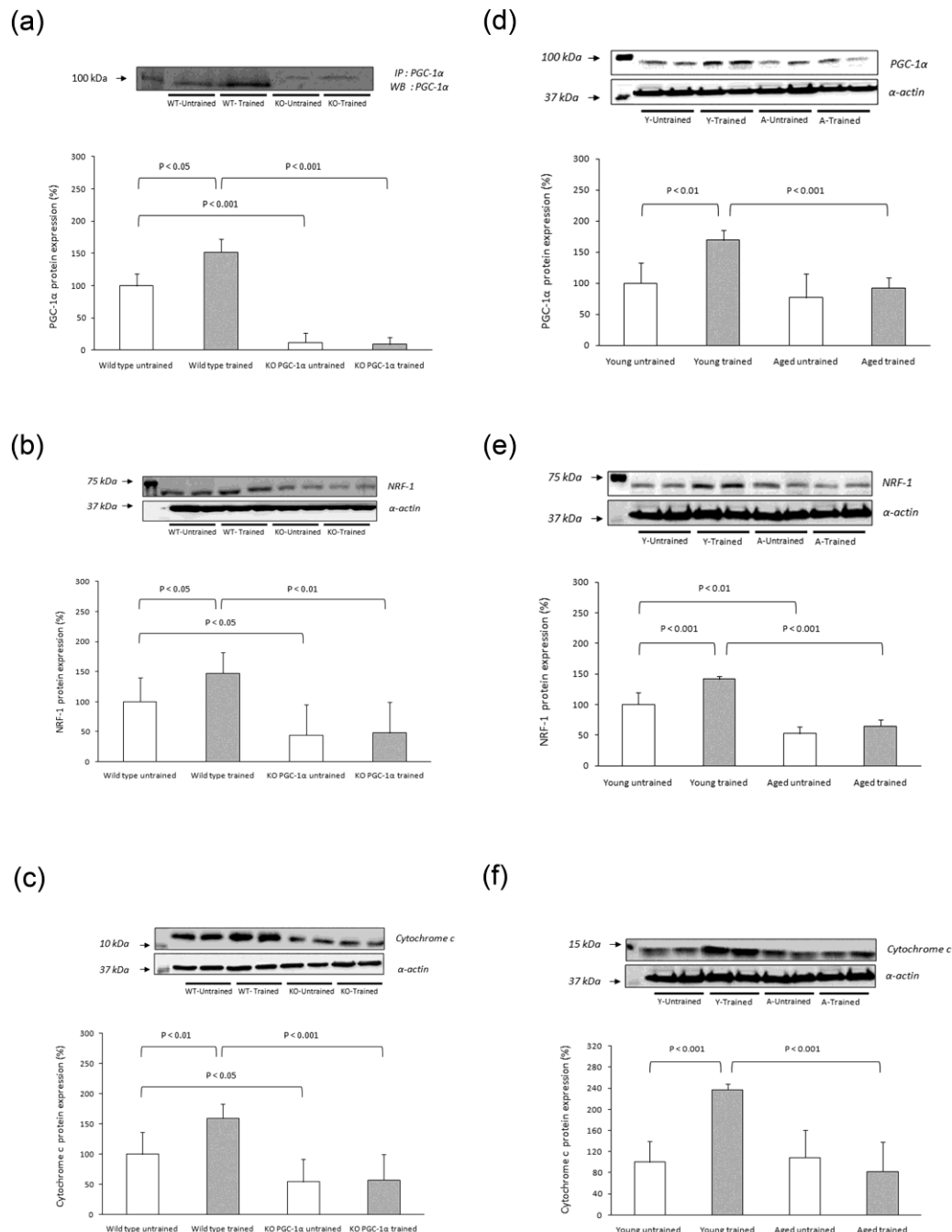


Figure 2. Muscle protein oxidation in untrained and trained animals. Western blotting analysis to detect carbonylated proteins (MW: 37 kDa). Representative experiments are shown. For the densitometric analysis of the results values are shown as mean (\pm SD) of (a) WT untrained (n=6), WT trained (n=8), PGC-1 α KO untrained (n=7) and PGC-1 α KO trained animals (n=6) (b) young untrained (n=6), young trained (n=6), aged untrained (n=6) and aged trained animals (n=6).

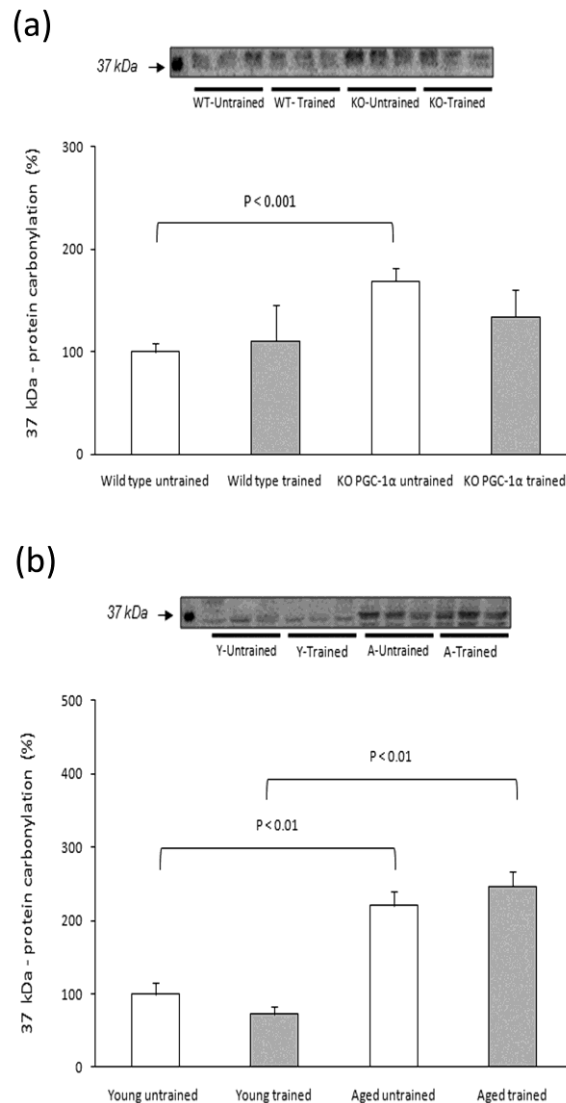


Figure 3. PGC-1 α protein levels and p38 activation in skeletal muscle of animals exposed to cold or treated with triiodothyronine. Representative experiments are shown. For the densitometric analysis of the results values are shown as mean (\pm SD) of (a,c) young and aged control and cold-exposed ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) animals (n=16) (b, d) young and aged animals treated with T3 (0.4 mg/kg) or only vehicle (0.9% NaCl-propylene glycol; 40:60 vol/vol)(n=16). The content of α -actin, a house-keeping protein marker in skeletal muscle, was determined in all the experimental groups.

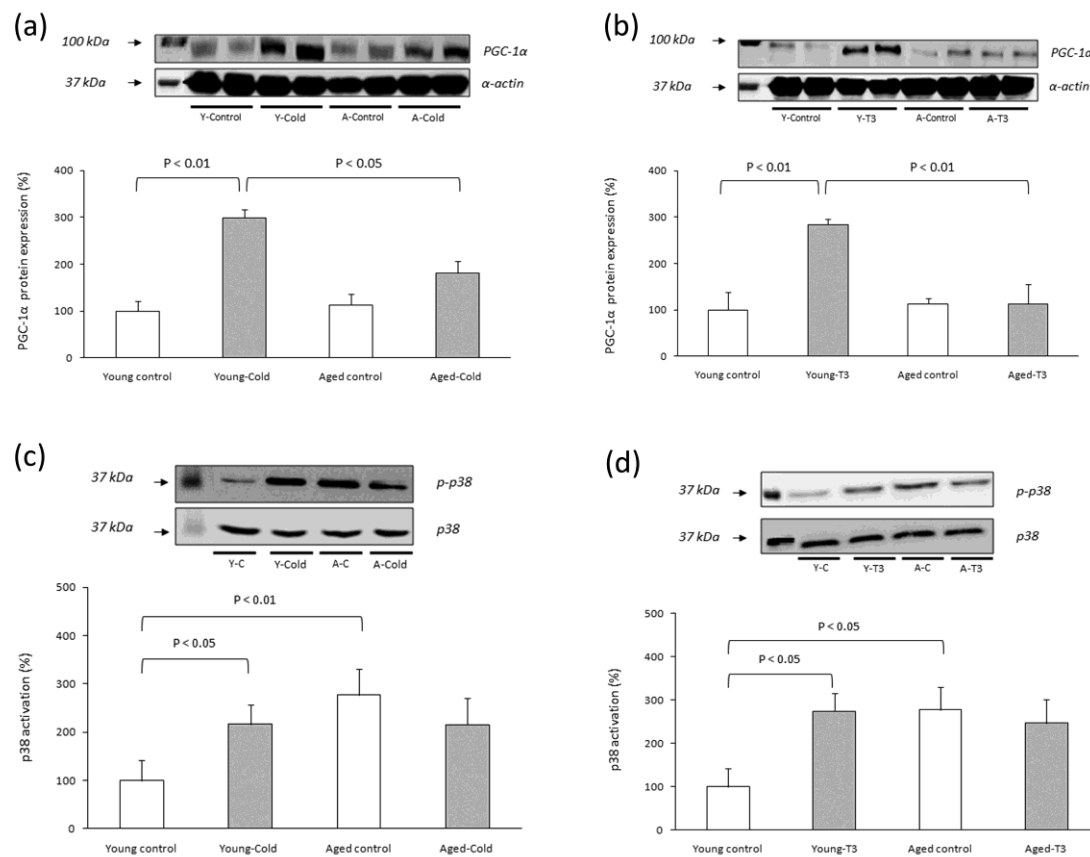
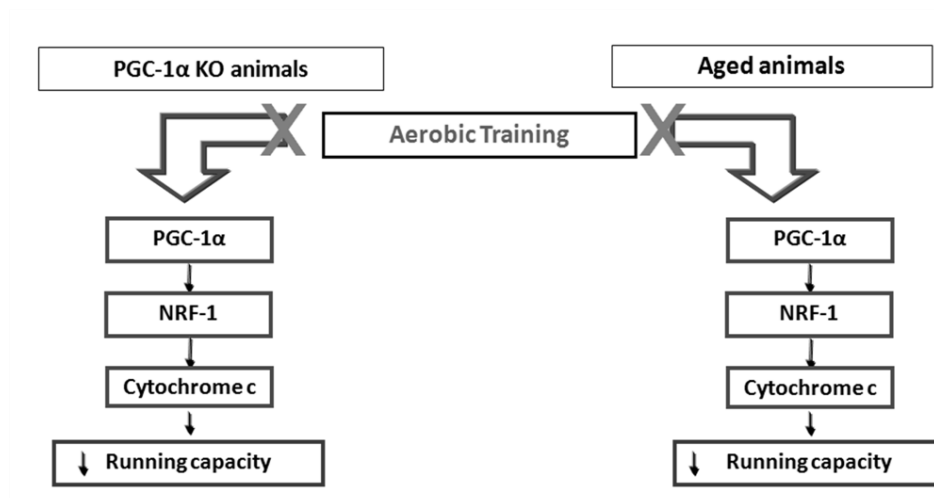


Figure 4. PGC-1 α is not functional in the aged skeletal muscle and it can be involved in the decrease in mitochondrial biogenesis during ageing. Proposed mechanism.



Chapitre 2 : Discussion générale et perspectives de travail

1. L'inactivité musculaire stimule l'activité de la xanthine oxydase : implications dans le stress oxydant et la sarcopénie du muscle âgé

La xanthine oxydase est responsable de la production d'O₂[•] au sein du cytosol du tissu musculaire (Gomez-Cabrera et al. 2005; Gomez-Cabrera et al. 2010). Même si la XO est présente au sein des cellules musculaires, l'essentiel de la production cytosolique d'ERDO par la XO provient des cellules endothéliales des capillaires musculaires situées à proximité (Moriwaki et al. 1996; Hellsten et al. 1997). Dans le cadre de l'étude n°1 de cette thèse, nous avons observé chez le rongeur que les activités plasmatiques et musculaires de la XO augmentaient suite à deux semaines de suspension par la queue. Pour déterminer si cette augmentation de l'activité de la XO joue un rôle dans l'atrophie musculaire des membres inférieurs inactifs, nous avons choisi de supplémenter les animaux durant la période de suspension avec de l'allopurinol, un inhibiteur reconnu de la XO (Pacher et al. 2006). Dans ce cadre, nous avons mis en évidence pour la première fois qu'une supplémentation en allopurinol chez le rongeur permet de prévenir en partie l'atrophie musculaire induite par l'inactivité musculaire. Ces résultats offrent tout d'abord des perspectives cliniques très intéressantes pour l'ensemble des personnes alitées de manière prolongée en raison d'interventions chirurgicales ou bien de pathologies chroniques. Sur le plan médical, l'allopurinol est actuellement utilisé pour les patients présentant une hyperuricémie symptomatique ou atteints de goutte (Pacher et al. 2006). Pourrait-on envisager d'élargir son usage à des patients alités de manière prolongée ? Pour confirmer cette hypothèse, un protocole non invasif pourrait être mis en place consistant à supplémenter en allopurinol des personnes alitées et à suivre l'évolution de la masse musculaire des membres immobilisés par IRM. Néanmoins, il est important de rester prudent quant aux résultats escomptés au regard de la dose que nous avons administrée aux rongeurs lors de notre expérimentation. En effet, celle-ci était de 50 mg/kg/jour, ce qui constitue environ 10 fois la dose clinique maximale utilisée chez l'homme (300 mg/jour) (Klein et al. 1996).

L'implication de la XO dans l'atrophie musculaire ouvre également des perspectives concernant le rôle de l'inactivité chronique dans le développement de la sarcopénie. Dans le cadre de l'étude n°2, nous avons observé que l'activité de la XO augmentait au sein du tissu musculaire âgé en accord avec de récents travaux de la littérature (Hofer et al. 2008; Ryan et al. 2010b; Ryan et al. 2011a). Ces résultats associés à ceux de l'étude n°1 suggèrent donc que l'inactivité chronique pourrait être impliquée dans l'augmentation de l'activité de la XO dans le tissu musculaire âgé, ce qui favoriserait par conséquent la sarcopénie. Un modèle expérimental s'appuyant sur des souris génériquement modifiées pourrait permettre de vérifier cette hypothèse. Nous pourrions ainsi étudier le développement de la sarcopénie chez des souris wild-type ou KO de XO selon leur statut

(sédentaires ou actives). Néanmoins, les seuls modèles existants de souris KO en XO (B6.129X1-*Xdh^{tm1Fink}*) disposent d'une espérance de vie de seulement un mois rendant toute recherche impossible sur le vieillissement. Pour ces raisons, le laboratoire FRAG de Valence travaille actuellement à la mise au point d'un modèle de souris knockdown en XO afin de disposer d'animaux avec une espérance de vie suffisamment longue pour déterminer le rôle de la XO dans le développement de la sarcopénie.

2. L'inactivité musculaire favorise l'activation de NF- κ B dans le tissu musculaire : implications dans le développement de la sarcopénie

Les premiers travaux montrant que l'inactivité physique induit une activation de NF- κ B au sein du tissu musculaire ont été menés par l'équipe de Susan Kandarian aux débuts des années 2000 (Hunter et al. 2002). Ces travaux suggéraient que l'activation de NF- κ B durant une période d'inactivité musculaire se faisait via une voie alternative impliquant la dégradation du précurseur protéique p105 en sous-unité p50 puis sa prise en charge par BCL-3, une protéine de la famille des I κ B favorisant la translocation de l'homodimère p50 dans le noyau (Hunter et al. 2002) (Figure 9)(Généralités sur la voie de signalisation NF- κ B, page 59). Par la suite, cette équipe confirma directement l'implication de cette voie dans l'atrophie musculaire en s'appuyant sur des souris KO pour les gènes p105/p50 ou BCL-3. Elle observa en effet que l'atrophie musculaire et l'activation de NF- κ B induites par 10 jours de suspension par la queue étaient significativement réduites chez les animaux KO de p105/p50 ou BCL-3 (Hunter and Kandarian 2004).

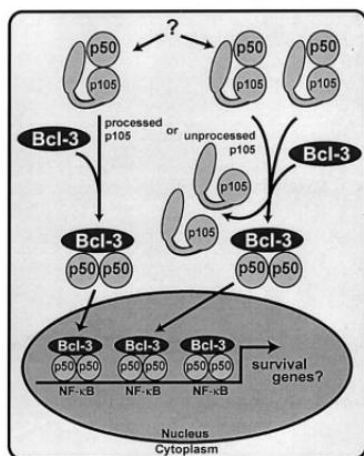


Figure 9. Modèle d'activation de NF- κ B par l'inactivité musculaire proposé par Hunter et al. (2002)

Néanmoins, des travaux plus récents ont démontré que la voie classique d'activation de NF- κ B était également impliquée dans l'atrophie musculaire induite par l'inactivité. En générant des souris mutantes dominantes négatives pour les isoformes d'IKK α et/ou d'IKK β dans le muscle soléaire, Van Gammeren et al. (2009) ont ainsi observé que l'atrophie musculaire induite par 7 jours d'immobilisation était réduite de 50% (pour une forme IKK α ou IKK β inactivée) à 70% (pour les deux

formes IKK α et IKK β inactivées). Ces travaux démontrent donc clairement l'implication du complexe NF- κ B p65/p50 dans l'atrophie induite par l'inactivité puisque les kinases IKK β et IKK α sont reconnues comme stimulant respectivement la translocation nucléaire de cet hétérodimère et son activité de fixation à l'ADN (Sizemore et al. 2002). Dans le cadre de l'étude n°1 de cette thèse, nous avons confirmé l'activation de la voie classique de NF- κ B en réponse à l'inactivité musculaire en observant les augmentations conjointes de l'activité de fixation à l'ADN du complexe p65/p50, du contenu nucléaire de la sous-unité p65 et de la phosphorylation de la protéine cytosolique I κ B α . Néanmoins, le rôle des ERDO dans l'activation de NF- κ B durant l'inactivité musculaire que nous avons mis en évidence constitue la véritable originalité de notre travail. En s'appuyant sur l'allopurinol en tant qu'antioxydant, nous avons en effet démontré pour la première fois que le stress oxydant chronique via la XO stimulait l'activité de fixation du complexe NF- κ B p65/p50 sur l'ADN au sein du tissu musculaire inactif en modulant l'état phosphorylé de la sous-unité p65. Plus spécifiquement, nos travaux suggèrent fortement que l'action des ERDO serait médiée par les kinases redox-sensibles IKK α et/ou p38 MAPK. Pour démontrer définitivement ce dernier mécanisme, il serait pertinent de travailler sur des modèles d'animaux KO (i.e. IKK α ou différentes isoformes de la p38 MAPK), immobilisé et traité ou non par l'allopurinol. Cette perspective de travail fait actuellement l'objet de recherche au sein de l'équipe du professeur Viña.

3. L'avance en âge induit un stress oxydant chronique : implications dans les altérations de la régénération musculaire et rôle potentiel de l'inactivité physique

Les altérations au niveau du processus de myogenèse au sein du tissu musculaire âgé constituent l'un des facteurs cellulaires favorisant le développement de la sarcopénie (Mécanismes centraux à l'origine de la sarcopénie, page 31). En effet, il a été démontré que l'activation comme la prolifération et la différenciation des SC étaient affectées avec l'avance en âge (Snijders et al. 2009). Même si le potentiel intrinsèque de régénération des SC peut être impliqué, la majorité des travaux de la littérature considèrent que la perturbation du microenvironnement joue un rôle majeur dans l'altération de la myogenèse avec l'âge (Carlson and Faulkner 1989; Conboy et al. 2003; Conboy et al. 2005; Hall et al. 2010). Plusieurs travaux impliquent notamment le NO et l'activité de Notch, 2 facteurs connus pour stimuler l'activation des SC lors d'une lésion musculaire (Tatsumi et al. 2002; Tatsumi et al. 2006). Différents travaux récents démontrent que la réduction des capacités de production de NO et de l'activité de Notch au sein du tissu musculaire âgé sont en partie responsables de la plus faible activation des SC (Conboy et al. 2003; Conboy et al. 2005; Betters et al. 2008; Leiter and Anderson 2010). Dans le cadre de l'étude n°2, nous nous sommes focalisés sur le rôle que pourraient jouer le stress oxydant et la myostatine dans ce processus de myogenèse, ces deux facteurs étant reconnus *in vitro* comme inhibant la prolifération et la différenciation des SC (Thomas et al.

2000; Ardite et al. 2004; Philip et al. 2005; Mackey et al. 2007). Nos résultats suggèrent tout d'abord que le stress oxydant chronique joue un rôle essentiel, via la p38 MAPK, en augmentant l'expression de la p21 connue pour inhiber les capacités de prolifération des SC avec l'avance en âge. Par ailleurs, nous suggérons également que la surexpression de la myostatine liée à l'âge pourrait jouer un rôle clé dans les processus de prolifération et différenciation en stimulant respectivement l'expression de la p21 et le catabolisme de certains facteurs de régulation myogénique comme MyoD ou la myogénine. Néanmoins, nous avons conscience des limites méthodologiques de l'étude n°2. Pour démontrer l'implication réelle du stress oxydant et de la myostatine dans les mécanismes précédemment évoqués, il faudrait travailler sur un tissu musculaire âgé en véritable état de régénération et non en condition basale. Dans l'avenir, nous envisageons donc d'étudier ces différents paramètres durant une période de régénération musculaire de plusieurs jours qui suit l'injection d'un myotoxique comme la bupivacaine chez des rats préalablement supplémentés ou non en antioxydants. Ces perspectives de recherche ont fait l'objet d'un projet scientifique déposé auprès de l'Association Française de Myopathie (AFM).

4. L'avance en âge induit une perte de réactivité de PGC-1 α : implications de l'inactivité chronique

Dans la dernière étude de cette thèse, nous avons voulu déterminer dans quelle mesure l'entraînement en endurance d'animaux âgés et en état d'inactivité chronique pouvait stimuler physiologiquement l'expression de PGC-1 α , un facteur de transcription prévenant la sarcopénie lorsqu'il est surexprimé artificiellement au sein du tissu musculaire (Wenz et al. 2009). Quelques travaux s'étaient déjà intéressés aux effets de l'inactivité musculaire et de l'avance en âge sur l'expression de PGC-1 α au sein du tissu musculaire. Ainsi, l'expression de l'ARNm de PGC-1 α semble clairement diminuée en réponse à l'inactivité radicale dans le tissu musculaire de rongeurs (Mazzatti et al. 2008; Oishi et al. 2008; Aoi et al. 2010). Les effets de l'âge sur l'expression de ce co-activateur apparaissent plus controversés. Si certaines études menées chez l'homme ne rapportent aucune modification de son expression dans le tissu musculaire (Short et al. 2003), la majorité observe que l'expression de PGC-1 α est réduite avec l'âge que ce soit chez l'homme (Ling et al. 2004; Safdar et al. 2010) ou le rongeur (Baker et al. 2006). Ces divergences peuvent s'expliquer en partie par l'approche transversale de ces études qui ne comparent pas forcément des populations jeunes et âgées de même âge et statut d'activité physique. En effet, Safdar et al. (2010) ont montré que si les individus étaient physiquement actifs, l'âge n'était plus associé à une diminution de PGC-1 α dans le tissu musculaire suggérant que l'âge en lui-même ne constituait pas nécessairement le principal facteur responsable de cette diminution. Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés davantage sur les capacités du tissu musculaire âgé à pouvoir stimuler l'expression de PGC-1 α en réponse à l'activité contractile, l'exposition au froid ou l'injection d'hormones thyroïdiennes. Nous observons chez le rongeur qu'avec l'âge le tissu musculaire perd la capacité à surexprimer ce facteur de transcription en

réponse à l'application d'un stimulus quel qu'il soit. Néanmoins, les travaux précédents de Safdar nous incitent à la prudence avant de conclure formellement que l'âge seul est responsable de cette perte de réactivité (Safdar et al. 2011). L'étude n°3 a concerné des rats âgés, élevés dans des cages traditionnelles, autrement dit très sédentaires et le programme d'entraînement proposé a été comparativement de courte durée (i.e. 3 semaines). Pour Lawler & Hindle (Lawler and Hindle 2011), des rats élevés dans cet environnement ne peuvent être considérés comme des rats contrôles tant ce mode d'élevage modifie leur comportement spontané. On ne peut donc exclure que l'inactivité chronique, prolongée, de ces animaux ait interagi avec l'âge et contribué, au moins partiellement à la perte de réactivité de PGC-1 α . Ces réflexions soulignent la nécessité impérieuse de revoir nos modèles animaux, et en particulier d'utiliser désormais comme rats contrôles des animaux élevés dans des cages équipées d'une roue d'activité permettant aux animaux de conserver, autant que faire se peut leur activité spontanée.

5. La surproduction chronique d'ERDO : un frein physiologique pour les adaptations cellulaires dans le muscle âgé ?

A. Le paradoxe des ERDO

Un grand nombre de travaux et notamment ceux de cette thèse montrent que la surproduction musculaire d'ERDO due à l'âge et l'inactivité favorise le développement de la sarcopénie (Powers et al. 2005; Powers et al. 2007; Rossi et al. 2008). Pourtant, il apparaît aussi de plus en plus évident que la production intracellulaire d'ERDO est nécessaire pour qu'un remodelage musculaire normal se produise en réponse à un stress comme l'exercice physique (Hamilton et al. 2003; Gomez-Cabrera et al. 2008a; Ristow et al. 2009). Il apparaît donc assez étonnant que la production d'ERDO, se produisant lorsque les fibres musculaires sont en activité, favorise le remodelage et non l'atrophie musculaire. A l'heure actuelle, il demeure encore difficile de comprendre complètement ce paradoxe. Néanmoins, les connaissances sur les implications biologiques de la production d'ERDO en réponse à l'exercice se sont rapidement développées ces dernières années et nous fournissent un certain nombre de réponses. La quantité d'ERDO produite dans une durée donnée apparaît finalement constituer la clé de ce paradoxe (Palomero and Jackson 2010). En effet, alors que la production continue et élevée d'ERDO induit des dommages cellulaires, réduit la synthèse protéique et stimule la protéolyse et l'apoptose, un exercice musculaire ponctuel conduit à une production courte et modérée d'ERDO qui n'induit pas tous ces effets délétères (Powers et al. 2011). Cette production courte et modérée pendant l'exercice va au contraire jouer un rôle positif dans la signalisation cellulaire au niveau musculaire en favorisant l'expression des gènes impliqués dans la défense antioxydante (e.g. HSP60, HSP70, NF- κ B, AP-1) ou la biogénèse mitochondriale (e.g. PGC-1 α) (Gomez-Cabrera et al. 2008a; Kang et al. 2009). Au contraire la surproduction chronique et prolongée d'ERDO dans le tissu musculaire âgé va avoir

un effet différent sur des mêmes voies de signalisation intracellulaire et favorisera la stimulation de gènes impliqués notamment dans l'atrophie musculaire (Bonetto et al. 2009). Le rôle dual du facteur de transcription redox-dépendant NF- κ B illustre parfaitement ce paradoxe. En effet, ce dernier favorise l'atrophie musculaire lorsqu'il est stimulé de manière prolongée comme nous l'avons démontré notamment dans l'étude n°1. Cependant, ce même facteur peut avoir des effets bénéfiques sur le tissu musculaire lors d'une stimulation brève, comme dans le cadre d'un exercice physique (Ji et al. 2004; Gomez-Cabrera et al. 2005), en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la défense antioxydante ou la vascularisation musculaire (e.g. MnSOD, iNOS, eNOS).

B. Une signalisation cellulaire altérée par la surproduction chronique d'ERDO

Ainsi, la production d'ERDO augmente dans le muscle en contraction et va moduler une partie des réponses cellulaires induites par l'activité contractile (Gomez-Cabrera et al. 2005; Vasilaki et al. 2006a). Dans ce contexte, on pouvait logiquement s'attendre dans l'étude n°3 à une augmentation de l'expression de PGC-1 α en réponse à l'entraînement dans le tissu musculaire âgé. A l'inverse, nous observons qu'avec l'âge le tissu musculaire perd la capacité à surexprimer ce facteur de transcription en réponse à l'entraînement. Ces résultats sont finalement en accord avec de récents travaux menés notamment par l'équipe de Malcolm Jackson. Ces derniers ont observé *ex vivo* qu'une période de 15 minutes de contractions isométriques chez la souris adulte provoquait l'activation de NF- κ B et AP-1 dans le tissu musculaire mais que ces activations étaient totalement absentes chez des souris âgées (Vasilaki et al. 2006a). Ljubicic et al. (2009) observent la même tendance concernant la p38 MAPK en s'appuyant sur un protocole expérimental semblable. Cette absence d'activation de la p38 MAPK dans le tissu musculaire de rongeurs âgés est en accord avec des travaux menés chez l'homme qui n'observent également pas d'activation de la p38 MAPK dans le muscle âgé en réponse à un exercice de musculation (Williamson et al. 2003). L'étude n°3 confirme cette incapacité du tissu musculaire âgé à activer la p38 MAPK en réponse à des stimuli spécifiques, non seulement l'entraînement mais également l'exposition au froid ou l'injection d'hormones thyroïdiennes.

Des recherches récentes ont montré que la surproduction chronique d'ERDO dans le muscle âgé semble en partie à l'origine de l'incapacité du muscle âgé à stimuler ces différentes voies de signalisation en réponse à la contraction musculaire. Pour arriver à cette conclusion, l'équipe de Malcolm Jackson a travaillé sur des souris KO CuZnSOD. Ces souris présentent dès l'âge adulte un stress oxydant chronique au sein du tissu musculaire semblable à celui observé chez des souris âgées (Vasilaki et al. 2010). En utilisant un protocole de 15 minutes de contractions isométriques, elle a ainsi observé que l'activité contractile induisait l'activation de NF- κ B et AP-1 dans le tissu musculaire de souris wild-type mais que ces activations étaient totalement absentes chez les souris KO CuZnSOD

(Vasilaki et al. 2010). Toutes ces données suggèrent que la surproduction chronique d'ERDO atténuerait la stimulation des gènes redox sensibles en réponse à l'activité contractile. Un schéma ci-dessous est proposé pour illustrer ce phénomène (Figure 10).

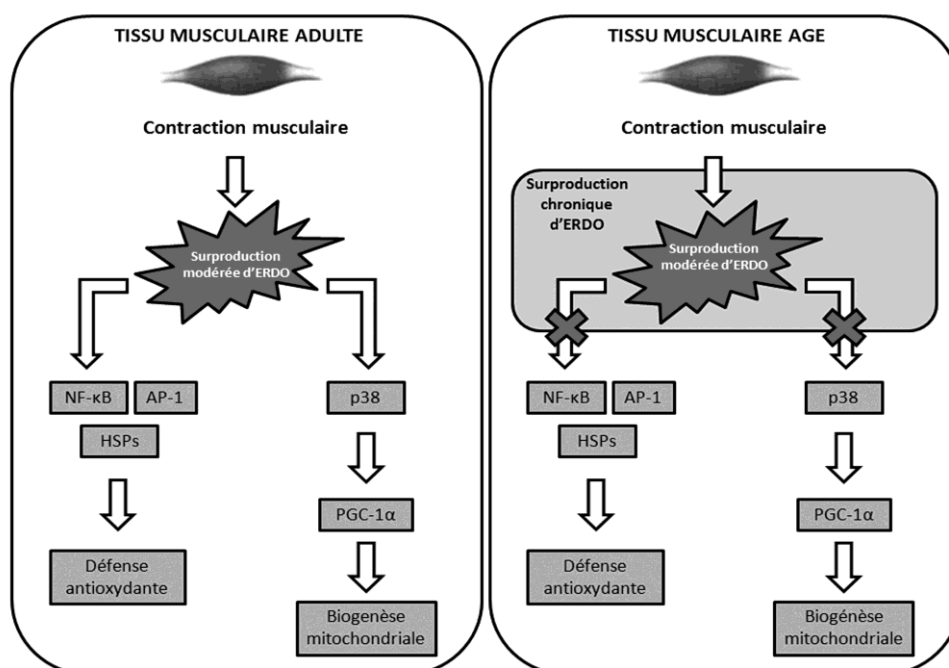


Figure 10. L'atténuation des réponses de signalisation intracellulaire à l'activité contractile dans le muscle âgé s'expliquerait par la surproduction chronique d'ERDO. HSP: heat shock protein; AP-1: activator protein 1; NF-κB: nuclear factor-κB; p38: p38 MAP kinase; PGC-1α: PPARγ-Coactivator-1α

L'implication des ERDO dans ces altérations conduit à nous interroger également sur le rôle joué par l'inactivité physique. Plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées pour clarifier ce point. L'une d'entre elles consisterait à déterminer la capacité du muscle âgé à stimuler l'expression des différents gènes redox sensitifs comme PGC-1α ou NF-κB lors d'un exercice physique chez des populations âgées sédentaires et physiquement actives depuis très longtemps. Cette expérimentation pourrait être effectuée chez des rongeurs âgés (élevés ou non dans des cages équipées d'une roue d'activité) ou chez l'homme en recrutant des personnes âgées ayant adopté depuis longtemps un mode de vie soit très sédentaire, soit modestement actif, soit très actif. Nous faisons, ici, l'hypothèse qu'une activité physique très régulière, commencée dès le plus jeune âge permettrait de limiter le stress oxydant chronique au sein du tissu musculaire, et donc de préserver la capacité du muscle à stimuler les gènes redox sensitifs en réponse à l'exercice physique lorsque la personne atteint un âge avancé. L'ensemble de ces perspectives de travail vise finalement à démontrer sur le plan mécanistique pourquoi l'activité physique régulière doit être pratiquée dès le plus jeune âge et durant l'ensemble de son existence pour prévenir la sarcopénie des personnes âgées (Pluijm et al. 2007).

CONCLUSION

L'objectif général de cette thèse était de déterminer *in vivo* dans quelles mesures un stress oxydant chronique au sein du tissu musculaire âgé module certaines voies de signalisation impliquées dans les mécanismes cellulaires à l'origine de la sarcopénie et de mieux comprendre le rôle de l'inactivité musculaire dans la régulation de ces mécanismes.

L'implication de la sarcopénie dans la fragilité et l'espérance de vie de la personne âgée a favorisé l'émergence de recherches intensives sur la compréhension de l'étiologie de la sarcopénie afin d'envisager de nouvelles actions thérapeutiques. Les travaux menés en culture cellulaire ont montré que le stress oxydant stimulait plusieurs mécanismes cellulaires impliqués dans l'atrophie musculaire comme la protéolyse ou les altérations du fonctionnement des cellules satellites. Ces travaux soutiennent l'hypothèse que le stress oxydant chronique observé dans le muscle âgé et/ou inactif pourrait promouvoir ces mécanismes et donc favoriser le développement de la sarcopénie. Plus spécifiquement, ils suggèrent que le lien entre le stress oxydant chronique et ces mécanismes pourrait être en partie médiés par des intermédiaires cellulaires comme des kinases, phosphatases ou facteurs de transcription redox sensibles tels que NF- κ B, la p38 MAPK ou PGC-1 α .

Dans une première étude, nous avons démontré qu'inhiber l'activité de la xanthine oxydase via l'allopurinol permet de prévenir l'atrophie musculaire induite par l'inactivité physique en limitant le stress oxydant et l'activité de NF- κ B. Ces travaux ont également permis d'identifier pour la première fois un mécanisme par lequel les ERDO active NF- κ B indépendamment d'I κ B α dans le tissu musculaire inactif.

Dans une seconde étude, nous avons montré *in vivo* que les ERDO pourraient être des éléments clés du microenvironnement musculaire âgé responsables de l'altération du fonctionnement des SC en modulant l'activité de la p38 MAPK et l'expression de la p21, un inhibiteur de la prolifération cellulaire. Des travaux complémentaires utilisant une supplémentation en antioxydants dans le muscle âgé permettrait d'étayer ce résultat.

Enfin, la dernière étude montre que l'âge est associé à une perte sévère de la réactivité de PGC-1 α . Cette étude souligne donc l'importance de maintenir la réactivité de PGC-1 α en réponse à l'exercice physique dans le but de repousser le plus tardivement possible l'apparition de la sarcopénie.

Nos travaux ne permettent pas néanmoins d'identifier précisément le rôle joué par l'inactivité physique chronique associée à l'âge dans tous ces processus mécanistiques. Des perspectives sont donc envisagées à l'issue de ce travail pour tenter de répondre à toutes ces interrogations et mieux comprendre l'étiologie de la sarcopénie. Une des étapes fondamentales doit passer par la conception de nouvelles approches expérimentales, comme la révision des modèles d'inactivité.

L'originalité de ce travail est de montrer la réalité biologique et physiopathologique du stress oxydant dans la sarcopénie. Il apporte des éléments fondamentaux dans la compréhension de certains mécanismes étiologiques. Il permet d'envisager d'éventuelles stratégies thérapeutiques basées sur l'identification de molécules cibles, sur un apport alimentaire adéquat en antioxydants et la pratique d'une activité physique régulière dès le plus jeune âge.

RESUMEN EN CASTELLANO

1. INTRODUCCIÓN

La esperanza de vida no ha cesado de aumentar en los dos últimos siglos en el seno de las sociedades occidentales a causa de los progresos sociales, sanitarios y tecnológicos. Así, este indicador ha aumentado de 45 años a 79 años en Francia entre 1900 y 2007 (promedio hombres y mujeres) (Stats INSEE, 2007) y ahora, las personas mayores de más de 70 años representan el tramo de edad que crece más rápidamente en las sociedades occidentales (Manton and Vaupel 1995). Las consecuencias del envejecimiento de la población son generalmente consideradas como catastróficas sobre el gasto público de salud. Pero más que el envejecimiento en sí mismo, es más el estado de salud de esa población mayor la que explica el crecimiento del gasto público de salud. Así, las políticas públicas de salud apuntan a que este alargamiento de la vida se haga en las mejores condiciones posibles de modo que el individuo siga su vida de manera independiente y sobre todo con una buena salud. En este contexto, la esperanza de vida saludable, es decir sin limitación de actividad o sin incapacidades importantes, se ha vuelto un indicador complementario para seguir el estado de salud de la población mayor. En Francia, la esperanza de vida saludable es de 62,1 años para los hombres y de 64,2 años para las mujeres (Stats INSEE, 2008). Eso significa que existe un periodo de aproximativamente 15 años durante el cual la persona mayor es considerada como potencialmente más frágil.

La fragilidad es un síndrome geriátrico que se traduce en la disminución del estado físico de una persona limitando las capacidades de su organismo a responder a un estrés (Fried et al. 2001). Se considera que entre un 10-20% de las personas mayores de más de 65 años son frágiles, esa proporción engloba al 46% en los ancianos de más de 85 años. Teniendo un organismo más débil para defenderse frente a diferentes estreses medioambientales, el anciano frágil está más expuesto a un gran número de patologías. Esas patologías van progresivamente haciéndolo aún más frágil y así, el anciano entra en un ciclo que se ha convenido en llamar “espiral de fragilidad” llevándolo a la pérdida de autonomía, dependencia, minusvalía, y finalmente la muerte (Figure 11). Por estos diferentes motivos, la lucha contra la fragilidad constituye actualmente un gran desafío de Salud Pública.

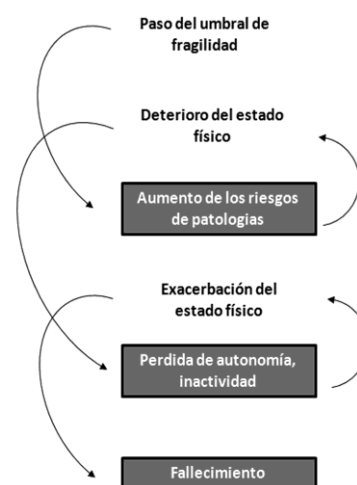


Figure 11. Espiral de la fragilidad

Dos de los factores principales que favorecen el desarrollo de la fragilidad son las progresivas disminuciones de la masa y de la fuerza muscular que ocurren con la edad. Este fenómeno se llama sarcopenia y deriva de las palabras griegas *sarx* (carne) y *penia* (pobreza) (Rosenberg 1997). La sarcopenia del anciano es evidentemente atribuible al proceso de envejecimiento, pero su desarrollo

puede ser acelerado como consecuencia de factores patológicos y comportamentales (Buford et al. 2010a). Entre estos factores la inactividad física parece jugar un papel esencial y su impacto podría ser más importante en un futuro próximo. El desarrollo del sector terciario, de los medios de transporte, así como la implantación de la cultura de la pantalla, han favorecido el desarrollo de una sociedad físicamente inactiva. Esa inactividad crónica contribuye a aumentar la preponderancia de un gran número de patologías crónicas y es responsable por ejemplo de los 340000 fallecimientos precoces en Estados Unidos en 2000 por un coste estimado a 150 millones de dólares al año (Walker et al. 2003). Pero independiente de las patologías crónicas, cada vez más pruebas se acumulan para demostrar que la inactividad física contribuye también a acelerar el desarrollo de la sarcopenia (Buford et al. 2010a).

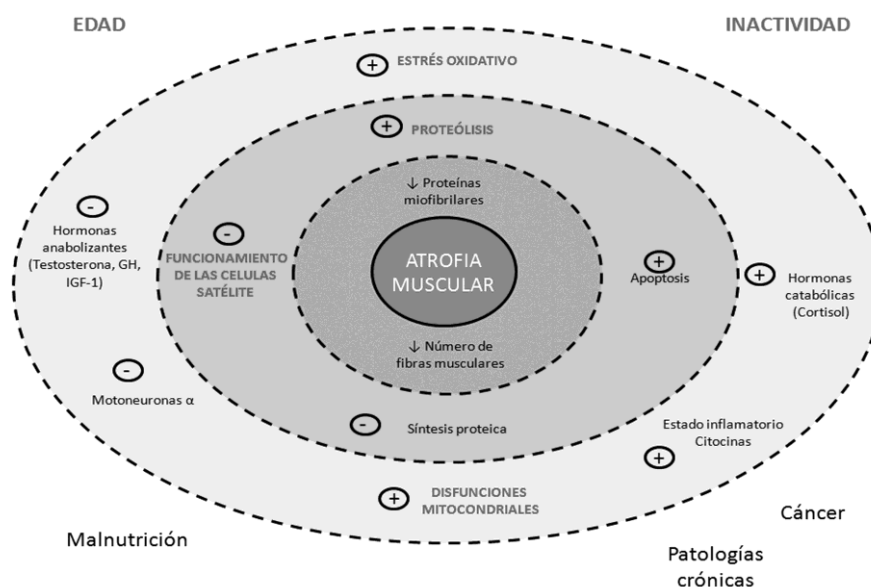


Figura 12. Esquema de los principales mecanismos implicados en la sarcopenia (adaptado de Buford et al. (2010)). Aunque la edad solo contribuye a la atrofia muscular, algunos comportamientos como la inactividad física o aún las patologías crónicas aceleran este proceso. La figura se lee de las anillas exteriores hacia las del interior llevando finalmente a la atrofia muscular. Los signos (+) indican una estimulación y los negativos (-) una inhibición del mecanismo. Los mecanismos escritos en mayúscula son aquellos en los cuales se focaliza la tesis.

La disminución de la fuerza muscular en la sarcopenia se atribuye principalmente a la pérdida de masa muscular. Esta atrofia muscular se explica en parte por la reducción de la síntesis proteica y el aumento de la degradación proteica vía la activación del sistema ubiquitina-proteasoma (Combaret et al. 2009). La apoptosis de los núcleos musculares que reduce el dominio nuclear de las fibras musculares constituye también un mecanismo esencial (Marzetti et al. 2008a). Este fenómeno es probablemente agravado por algunas alteraciones en la regeneración muscular que limitan la incorporación de nuevos núcleos en el seno de las fibras musculares (Le Grand and Rudnicki 2007).

(Figure 3). Aunque estos mecanismos centrales responsables de la atrofia muscular no se activan exactamente de la misma manera, existen grandes similitudes entre los efectos de la edad y de la inactividad lo que hace suponer que la inactividad física podría favorecer el desarrollo de la sarcopenia en los ancianos. Esos mecanismos son regulados por numerosos factores celulares y sistémicos como por ejemplo la disfunción mitocondrial (Huang and Hood 2009), el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias y una disminución de la producción de hormonas anabolizantes (GH, IGF-1, testosterona, insulina) (Lee et al. 2007) (Figure 3). Las relaciones e interacciones entre estos múltiples factores son aun poco conocidas. Estudios recientes subrayan la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de la sarcopenia. Así el estrés oxidativo podría ser un candidato potencial para relacionar estos factores.

La edad, como la inactividad, están asociados a un aumento de la producción de radicales libres en el músculo esquelético (Bejma and Ji 1999; Capel et al. 2005; Vasilaki et al. 2006a; Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). La literatura revela que existen similitudes en las fuentes de producción de radicales libres en el músculo esquelético viejo o inactivo. Así, las disfunciones mitocondriales y el aumento de la actividad de la xantina oxidasa (XO) serían las principales fuentes celulares responsables de esta sobreproducción (Capel et al. 2004; Lambertucci et al. 2007; Hofer et al. 2008; Kavazis et al. 2009; Xu et al. 2010). Sin embargo, no se sabe aún en que proporciones estas dos fuentes están implicadas en la sobreproducción de radicales libres en el músculo viejo y como la inactividad contribuye a este sobreproducción. A pesar de las adaptaciones del sistema de defensa antioxidante en el músculo viejo o inactivo (Pansarasa et al. 1999; Hollander et al. 2000; Servais et al. 2007), la sobreproducción de radicales libres vuelve a ser demasiado importante y genera un estrés oxidativo crónico (Pansarasa et al. 1999; Lambertucci et al. 2007; Andrianjafiniony et al. 2010). Recientes trabajos realizados en modelos experimentales celulares han demostrado que el estrés oxidativo estimula varios mecanismos implicados en la atrofia muscular como la proteólisis o las alteraciones del funcionamiento de las células satélite. Por estas razones, el estrés oxidativo crónico en el músculo viejo y/o inactivo podría promover estos mecanismos, y así favorecer el desarrollo de la sarcopenia. Sin embargo, la relación entre los mecanismos celulares implicados en la sarcopenia y el estrés oxidativo necesita de ser demostrado *in vivo* en el músculo. Esta relación podría ser en parte asegurada por algunas vías de señalización intracelulares implicando kinasas, fosfatasa y factores de transcripción redox sensibles como por ejemplo NF- κ B, p38 MAPK y PGC-1 α .

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis consiste en determinar *in vivo* qué papel juega el estrés oxidativo crónico generado por la edad y/o la inactividad física en la regulación de algunas cascadas de señalización implicadas en los mecanismos responsables de la sarcopenia.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- **Determinar si la inhibición de la actividad xantina oxidasa permite prevenir la atrofia muscular inducida por la inactividad física en ratas.** Nuestra principal hipótesis es que la xantina oxidasa constituye una fuente importante de radicales libres en el músculo y que está implicada en el estrés oxidativo crónico inducido por la inactividad muscular. La reducción de su actividad podría limitar la proteólisis muscular modulando las cascadas de señalización en las que están implicadas NF- κ B o p38 MAPK (Estudio 1).
- **Determinar si el estrés oxidativo crónico en el músculo de ratas viejas puede modular algunas vías de señalización implicadas en la regulación de la actividad de las células satélites.** Nuestra principal hipótesis es que p38 MAPK podría jugar un papel esencial en estos procesos (Estudio 2)
- **Determinar si el ejercicio físico permite estimular la expresión de PGC-1 α en el músculo esquelético de ratas viejas.** PGC-1 α es un factor de transcripción reconocido como protector contra el desarrollo de la sarcopenia. Nuestra hipótesis es que esta estimulación podría ser limitada por el estrés oxidativo crónico al que se ven sometidos los animales viejos que se han mantenido inactivos desde su juventud (Estudio 3).

2. CONTRIBUCIÓN PERSONAL

ESTUDIO N°1: Reducir el estrés oxidativo inducido por la xantina oxidasa previene la atrofia muscular y la activación de NF- κ B durante un periodo de inactividad física

INTRODUCCIÓN

Se sabe que la inactividad muscular es responsable de una importante atrofia muscular y de alteraciones de las propiedades contráctiles y metabólicas del músculo (Andrianjafiniony et al. 2010; Borina et al. 2010). Se considera que la pérdida de masa muscular durante un periodo de inactividad se explica a la vez por la apoptosis de los núcleos musculares (Oishi et al. 2008; Siu 2009) y por las alteraciones del recambio proteico (Yimlamai et al. 2005; Vazeille et al. 2008). Entre los factores intracelulares implicados en estos procesos NF- κ B, que estimula la degradación proteica, podría jugar un papel esencial (Li et al. 2008). La cascada de señalización intracelular de NF- κ B implica algunas cinasas redox sensibles (Pantano et al. 2006) y publicaciones recientes han propuesto que la sobreproducción crónica de radicales libres podría jugar un papel en la activación de NF- κ B durante un periodo de inactividad muscular (Powers et al. 2010).

Por otro lado, se sabe también que la inactividad muscular induce una sobreproducción de radicales libres en el músculo esquelético (Arbogast et al. 2007; Xu et al. 2010). Algunos trabajos han demostrado que la disfunción mitocondrial podría ser clave en esta sobreproducción (Capel et al. 2004; Kavazis et al. 2009; Xu et al. 2010). Aunque algunos estudios han mostrado un aumento de la actividad de la XO en el músculo inactivo (Kondo et al. 1993c), su nivel de implicación en la producción total de estos radicales y su impacto sobre la masa muscular requieren de un estudio más exhaustivo.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo son: 1) Determinar la implicación de la XO en la atrofia muscular inducida por la inactividad muscular pero también 2) Establecer si la sobreproducción de radicales libres contribuye a estimular la cascada de señalización de NF- κ B. Para alcanzar estos objetivos hemos usado un modelo de suspensión de patas traseras. Este modelo es el que más frecuentemente se ha utilizado para inducir una inactividad muscular de los miembros inferiores en ratas (Morey-Holton and Globus 2002). Para determinar la implicación de la XO en la atrofia muscular suplementamos con alopurinol, un inhibidor reconocido de la XO, a un grupo de animales (Gomez-Cabrera et al. 2005).

RESULTADOS

La pérdida de masa muscular del sóleo inducido por 14 días de inactividad esta significativamente disminuida en los animales suplementados con alopurinol. Las actividades

plasmática y muscular de la XO aumentan después del periodo de inactividad como otros marcadores musculares del estrés oxidativo (proteínas carboniladas, contenido proteico de la catalasa y la CuZnSOD). El alopurinol inhibe completamente la actividad de la XO, pero también previene el aumento de las proteínas carboniladas causado por la inactividad.

Testamos también como los radicales libres producidos por la XO durante la inactividad muscular contribuyen a activar la cascada de señalización de NF- κ B en el músculo. Se observa la activación de IKK α , p38 MAPK, de la subunidad p65 de NF- κ B y de la unión del complejo NF- κ B al ADN en el músculo inactivo. El alopurinol previene completamente estas activaciones. Sin embargo, el alopurinol no limita la fosforilación de I κ B α y la translocación de la subunidad p65 al núcleo. De manera interesante, los niveles de ARNm de las ubiquitina ligasas MAFbx y MuRF1 aumentan en el músculo inactivo pero la suplementación con alopurinol previene este incremento.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la inhibición de la actividad de la XO con alopurinol previene la pérdida de masa muscular inducida por la inactividad física limitando el estrés oxidativo y la activación de NF- κ B. Este trabajo ha permitido por primera vez identificar un mecanismo por el cual los radicales libres estimulan la actividad del complejo NF- κ B p65 mediante una cascada de señalización independiente de I κ B α en el músculo inactivo. Este estudio ofrece perspectivas clínicas interesantes sobre la utilización del alopurinol para limitar la atrofia muscular observada en varias condiciones patológicas.

ESTUDIO N°2: Papel de los radicales libres y la miostatina en la regulación de los genes miogénicos en el músculo esquelético viejo**INTRODUCCIÓN**

La sarcopenia es un síndrome geriátrico que se caracteriza inicialmente por una disminución de la masa muscular que agravándose inducirá un deterioro de la fuerza muscular y del rendimiento físico (Cruz-Jentoft et al. 2010). Esta disminución de la masa muscular con la edad se explica a la vez por las alteraciones del recambio proteico y por una exacerbación de la apoptosis (Marzetti et al. 2008a). Además de estos mecanismos, es importante subrayar el papel de la alteración del funcionamiento de las células satélite (CS) responsables del proceso de regeneración muscular (Gallegly et al. 2004; Le Grand and Rudnicki 2007).

La activación de la CS quiescentes seguido de su proliferación y diferenciación constituyen los diferentes pasos del proceso de regeneración muscular (Le Grand and Rudnicki 2007). Este proceso, también llamado miogénesis, se regula por varios factores celulares denominados factores de regulación miogénicos (MRFs) y los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CKI) (Sabourin and Rudnicki 2000). El potencial de regeneración muscular está afectado con la edad a causa de una alteración de la actividad de las CS, y probablemente de la expresión de los MRFs (Le Grand and Rudnicki 2007). Numerosos trabajos apoyan la hipótesis que el microambiente en el cual se sitúan las CS constituye el factor principal responsable de la reducción de la actividad de las CS con la edad (Carlson and Faulkner 1989; Conboy et al. 2005; Carlson and Conboy 2007). Los radicales libres producidos en el músculo son potenciales candidatos responsables de la reducción de la actividad de las CS con la edad. En efecto, varios trabajos realizados en células C2C12 han demostrado que la reducción del microambiente pro-oxidante favorecería la proliferación y la diferenciación de los mioblastos (Renault et al. 2002; Ardite et al. 2004; Hansen et al. 2007a). La miostatina podría ser también un elemento esencial del microambiente de las CS viejas que explicaría la disminución de la actividad de las células satélites. Algunos estudios realizados en cultivos demuestran el papel inhibitor de la miostatina tanto sobre la proliferación (Thomas et al. 2000) como sobre la diferenciación de las CS (Langley et al. 2002). Aunque las implicaciones de los radicales libres y de la miostatina en el proceso de regeneración muscular son reconocidos *in vitro*, su papel en la regeneración *in vivo* en el músculo viejo todavía no ha sido establecido. Por tanto, el objetivo de este estudio es el de determinar el papel de los radicales libres y de la miostatina en la regulación de la expresión de los MRFs y CKI en el músculo viejo.

Para alcanzar estos objetivos, hemos estudiado el músculo gastrocnemio de ratas Wistar macho jóvenes (3 meses) y viejas (24 meses).

RESULTADOS

Se observa un aumento con la edad del ARNm de los factores de regulación miogénicos Myf-5, MyoD y miogenina en el músculo gastrocnemio. Esos incrementos parecen inefficientes para aumentar el contenido proteico de los MRFs, como muestra la ausencia de modificaciones del contenido proteico de Myf-5, MyoD y miogenina en el músculo viejo. Esos resultados sugieren que alteraciones post-traduccionales podrían limitar la expresión de los MRFs en el músculo viejo, y probablemente la actividad de las células satélite. Observamos también que el contenido proteico de la miostatina aumenta con la edad en el músculo viejo. Este aumento podría explicar en parte la ausencia de modificaciones de la expresión proteica de los MRFs ya que trabajos *in vitro* han demostrado que la miostatina induce el catabolismo de los MRFs (Langley et al. 2002; Joulia et al. 2003).

La edad induce un estrés oxidativo crónico en el gastrocnemio como demuestran los aumentos de la actividad de la xantina oxidasa, del ratio glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) y de las proteínas carboniladas. Este estrés oxidativo permite explicar la hiperfosforilación de la cinasa redox sensible p38 MAPK, observada en el músculo viejo. Por otro lado observamos a nivel muscular un incremento del ARNm y del contenido proteico de p21, una CKI responsable de la inhibición de la proliferación de las CS, con la edad. Consideramos que la sobreexpresión de la miostatina en el músculo viejo podría contribuir a explicar este aumento de la expresión de p21 (Thomas et al. 2000; Philip et al. 2005). Sin embargo, p38 MAPK podría también jugar un papel importante en este proceso ya que se ha reconocido su papel en la estabilización del contenido proteico de p21 (Kim et al. 2002). Esos resultados sugieren que el estrés oxidativo crónico podría favorecer la reducción con el edad de la proliferación de las CS según la cascada de señalización siguiente: Radicales libres → p38 MAPK → p21

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que los radicales libres y la miostatina podrían ser elementos claves del microambiente muscular viejo responsable de la alteración del funcionamiento de las CS, modulando la expresión de los MRFs y de p21. Sin embargo, trabajos adicionales usando tratamientos antioxidantes y/o inhibidores de miostatina en el músculo viejo son necesarios para confirmar esta hipótesis.

ESTUDIO N°3: La edad, combinada con la inactividad crónica, induce una pérdida de reactividad de PGC-1 α en respuesta al ejercicio físico**INTRODUCCIÓN**

Se sabe que la edad está asociada a una progresiva disminución de la masa y de la fuerza muscular (Iannuzzi-Sucich et al. 2002; Doherty 2003). Este síndrome geriátrico, llamado sarcopenia (Rosenberg 1997), es también asociado con perturbaciones metabólicas tales como la reducción del contenido y del funcionamiento mitocondrial (Coggan et al. 1992; Chabi et al. 2008). Los mecanismos específicos responsables de la disminución de la capacidad mitocondrial en el músculo viejo se desconocen. Sin embargo, la acumulación de daño oxidativo y la exacerbación de la apoptosis parecen muy implicadas en esta disminución (Bua et al. 2002; Chabi et al. 2008). Se sabe que el coactivador-1 α del receptor- γ activado por proliferación del peroxisoma PPAR γ (PGC-1 α) juega un papel central en la regulación de la biogénesis mitocondrial (Puigserver and Spiegelman 2003; Hood et al. 2006). Apoyándose sobre modelos transgénicos sobreexpresando PGC-1 α en el músculo, algunos trabajos han demostrado que PGC-1 α previene la sarcopenia reduciendo las actividades apoptóticas, autofágicas y proteolíticas (Wenz et al. 2009). Esos trabajos sugieren que la modulación del contenido de PGC-1 α en el músculo podría ser una estrategia eficiente para prevenir algunos mecanismos celulares implicados en el desarrollo de la sarcopenia. En la medida que se sabe que el entrenamiento de resistencia aumenta la expresión de PGC-1 α en el músculo joven (Gomez-Cabrera et al. 2008a), unas de las estrategias de tratamiento podría apoyarse sobre esta modalidad de ejercicio para luchar contra los mecanismos implicados en la sarcopenia. Númerosos investigadores sostienen la idea de que los roedores usados para la investigación biomédica que viven en condiciones estándares de animalario se encuentran en un estado de inactividad crónica debido al escaso tamaño de sus jaulas y a la ausencia de ruedas de actividad (Martin et al. 2010). En este contexto, el objetivo de este estudio es el de determinar en qué medida modular la expresión de PGC-1 α con el ejercicio físico podría constituir un medio para estimular la biogénesis mitocondrial en el músculo de roedores viejos crónicamente inactivos.

RESULTADOS

En primer lugar, observamos en ratones KO de PGC-1 α que un entrenamiento de resistencia de 4 semanas no estimulaba la biogénesis mitocondrial en el músculo esquelético. En efecto, los contenidos proteicos del factor de transcripción NRF-1 (regulado por PGC-1 α) y de citocromo c (un marcador del contenido mitocondrial) no aumentan en el músculo de los ratones KO de PGC-1 α entrenados, mientras que este aumento si se produce en los animales silvestres (Wild Type). Esto se traduce funcionalmente en una capacidad de resistencia (tiempo de carrera hasta el agotamiento) ~70% inferior en los ratones KO de PGC-1 α .

Un resultado similar se observa en ratas Wistar jóvenes (3 meses) y viejas (24 meses) sometidas a un protocolo de entrenamiento similar. En efecto, constatamos que el entrenamiento de resistencia aumenta la expresión de PGC-1 α , NRF-1 y de citocromo c en el músculo joven, mientras que ninguna modificaciones se observa en el músculo viejo. Al igual que en los ratones KO de PGC-1 α , la capacidad de resistencia de las ratas viejas es inferior al 63% cuando se compara con las ratas jóvenes.

Se sabe que la expresión de PGC-1 α puede ser también estimulada en el músculo esquelético con una exposición prolongada al frío o con la hormona tiroidea (T3) (Puigserver et al. 1998; Irrcher et al. 2003). En este estudio, confirmamos que una exposición de 24h a 4°C o una inyección de T3 (0.4 mg·kg⁻¹) estimulan en el músculo de ratas jóvenes la expresión de PGC-1 α y activan la p38 MAPK. Sin embargo, estas mismas condiciones en el músculo de ratas viejas no modifican ni la expresión de PGC-1 α , ni la actividad de la p38 MAPK. La presencia de un estrés oxidativo crónico en el músculo viejo, como evidencia el contenido superior de proteínas carboniladas, sugiere el papel del estrés oxidativo en la incapacidad del músculo viejo para estimular PGC-1 α .

CONCLUSIÓN

El conjunto de estos resultados demuestra que la edad, combinada con un estado de inactividad crónico, induce una pérdida de reactividad de PGC-1 α en respuesta al ejercicio físico y otros estímulos reconocidos para estimular su expresión (Frío y T3). Este trabajo subraya la importancia de mantener la reactividad de PGC-1 α en respuesta a la actividad contráctil con el fin de mantener un funcionamiento muscular normal.

3. CONCLUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue el de determinar *in vivo* en qué medida un estrés oxidativo crónico en el músculo esquelético viejo modula algunas cascadas de señalización implicadas en los mecanismos celulares responsables de la sarcopenia, y de entender mejor el papel de la inactividad muscular en la regulación de esos mecanismos.

La implicación de la sarcopenia en la fragilidad y la esperanza de vida de la persona mayor ha favorecido el desarrollo de investigaciones sobre la comprensión de la etiología de la sarcopenia con el fin de ampliar las perspectivas terapéuticas. Los trabajos en cultivos celulares han mostrado que el estrés oxidativo estimula varios mecanismos celulares implicados en la atrofia muscular como la proteólisis o las alteraciones del funcionamiento de las células satélite. En este contexto, hemos trabajado con la hipótesis que el estrés oxidativo crónico, observado en el músculo viejo y/o inactivo, podría promover estos mecanismos y así favorecer el desarrollo de la sarcopenia. Más específicamente, hemos sugerido que la relación entre el estrés oxidativo y estos mecanismos podría ser en parte asegurada por algunos intermediarios celulares como cinasas, fosfatasa o factores de transcripción redox sensibles como NF- κ B, p38 MAPK o PGC-1 α .

En un primer estudio, hemos demostrado que la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa con alopurinol permite prevenir la atrofia muscular inducida por la inactividad física limitando el estrés oxidativo y la actividad de NF- κ B. Este trabajo ha permitido por primera vez identificar un mecanismo por el cual los radicales libres estimulan la actividad del complejo NF- κ B p65 vía una cascada de señalización independiente de I κ B α en el músculo inactivo.

En un segundo estudio, hemos mostrado *in vivo* que los radicales libres podrían ser elementos claves del microambiente muscular viejo responsables de la alteración del funcionamiento de las CS modulando la actividad de p38 MAPK y la expresión de p21, un inhibidor de la proliferación celular. Sin embargo, trabajos adicionales usando tratamientos antioxidantes en el músculo viejo son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Por último, un tercer estudio ha puesto en evidencia la implicación de la edad, combinada con un estado de inactividad crónica, en la pérdida de la reactividad de PGC-1 α en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos como por ejemplo el ejercicio físico. Este trabajo subraya la importancia de mantener la reactividad de PGC-1 α en respuesta al ejercicio físico con el fin de retrasar la posible aparición de la sarcopenia.

REFERENCES

- Aagaard, P, Magnusson, PS, et al. (2007). Mechanical muscle function, morphology, and fiber type in lifelong trained elderly. *Med Sci Sports Exerc*, 39 (11), 1989-1996.
- Aagaard, P, Suetta, C, et al. (2010). Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand J Med Sci Sports*, 20 (1), 49-64.
- Acharyya, S, Villalta, SA, et al. (2007). Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 117 (4), 889-901.
- Adhihetty, PJ, O'Leary, MF, et al. (2008). Mitochondria in skeletal muscle: adaptable rheostats of apoptotic susceptibility. *Exerc Sport Sci Rev*, 36 (3), 116-121.
- Adhihetty, PJ, Uguccioni, G, et al. (2009). The role of PGC-1alpha on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297 (1), C217-225.
- Akimoto, T, Li, P, et al. (2008). Functional interaction of regulatory factors with the Pgc-1alpha promoter in response to exercise by in vivo imaging. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (1), C288-292.
- Akimoto, T, Pohnert, SC, et al. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*, 280 (20), 19587-19593.
- Al Snih, S, Markides, KS, et al. (2004). Hand grip strength and incident ADL disability in elderly Mexican Americans over a seven-year period. *Aging Clin Exp Res*, 16 (6), 481-486.
- Allen, DL, Roy, RR, et al. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, 22 (10), 1350-1360.
- Allen, DL, Yasui, W, et al. (1996). Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol*, 81 (1), 145-151.
- Allman, BL and Rice, CL (2001). Incomplete recovery of voluntary isometric force after fatigue is not affected by old age. *Muscle Nerve*, 24 (9), 1156-1167.
- Altun, M, Bergman, E, et al. (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav*, 92 (5), 911-923.
- Altun, M, Besche, HC, et al. (2010). Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem*, 285 (51), 39597-39608.
- Alway, SE, Degens, H, et al. (2002). Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (2), R411-422.
- Andersen, JL, Gruschy-Knudsen, T, et al. (1999). Bed rest increases the amount of mismatched fibers in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 86 (2), 455-460.
- Anderson, EJ and Neuffer, PD (2006). Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H(2)O(2) generation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290 (3), C844-851.
- Anderson, R and Prolla, T (2009). PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions. *Biochim Biophys Acta*, 1790 (10), 1059-1066.
- Anderson, RM, Barger, JL, et al. (2008). Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*, 7 (1), 101-111.
- Anderson, RM and Weindruch, R (2009). Metabolic reprogramming, caloric restriction and aging. *Trends Endocrinol Metab*, 21 (3), 134-141.
- Andrianjafiniony, T, Dupre-Aucouturier, S, et al. (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299 (2), C307-315.
- Aniansson, A, Grimby, G, et al. (1992). Compensatory muscle fiber hypertrophy in elderly men. *J Appl Physiol*, 73 (3), 812-816.
- Aniansson, A, Hedberg, M, et al. (1986). Muscle morphology, enzymatic activity, and muscle strength in elderly men: a follow-up study. *Muscle Nerve*, 9 (7), 585-591.
- Aoi, W, Naito, Y, et al. (2010). The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298 (4), E799-806.
- Appell, HJ (1986). Morphology of immobilized skeletal muscle and the effects of a pre- and postimmobilization training program. *Int J Sports Med*, 7 (1), 6-12.

- Appell, HJ, Duarte, JA, et al. (1997). Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. *Int J Sports Med*, 18 (3), 157-160.
- Aranda, R, Domenech, E, et al. (2007). Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radic Res*, 1-6.
- Arbogast, S, Smith, J, et al. (2007). Bowman-Birk inhibitor concentrate prevents atrophy, weakness, and oxidative stress in soleus muscle of hindlimb-unloaded mice. *J Appl Physiol*, 102 (3), 956-964.
- Ardite, E, Barbera, JA, et al. (2004). Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol*, 165 (3), 719-728.
- Aronson, D, Violan, MA, et al. (1997). Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 99 (6), 1251-1257.
- Asensi, M, Sastre, J, et al. (1994). A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem*, 217 (2), 323-328.
- Baar, K, Wende, AR, et al. (2002). Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*, 16 (14), 1879-1886.
- Bader, N and Grune, T (2006). Protein oxidation and proteolysis. *Biol Chem*, 387 (10-11), 1351-1355.
- Baeuerle, PA and Henkel, T (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 12 141-179.
- Bahi, L, Garnier, A, et al. (2005). Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *J Cell Physiol*, 203 (3), 589-598.
- Baker, DJ, Betik, AC, et al. (2006). No decline in skeletal muscle oxidative capacity with aging in long-term calorically restricted rats: effects are independent of mitochondrial DNA integrity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61 (7), 675-684.
- Baker, DJ and Hepple, RT (2006). Elevated caspase and AIF gene expression correlate with progression of sarcopenia during aging in male F344BN rats. *Exp Gerontol*, 41 (11), 1149-1156.
- Bakkar, N, Wang, J, et al. (2008). IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *J Cell Biol*, 180 (4), 787-802.
- Balage, M, Averous, J, et al. (2010). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr Biochem*, 21 (4), 325-331.
- Balogopal, P, Rooyackers, OE, et al. (1997). Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 1), E790-800.
- Balogopal, P, Schimke, JC, et al. (2001). Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (2), E203-208.
- Baldwin, KM and Haddad, F (2001). Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol*, 90 (1), 345-357.
- Bamman, MM, Ragan, RC, et al. (2004). Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women. *J Appl Physiol*, 97 (4), 1329-1337.
- Barreiro, E, Gea, J, et al. (2005). Protein carbonyl formation in the diaphragm. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 32 (1), 9-17.
- Bassey, EJ and Harries, UJ (1993). Normal values for handgrip strength in 920 men and women aged over 65 years, and longitudinal changes over 4 years in 620 survivors. *Clin Sci (Lond)*, 84 (3), 331-337.
- Bauer, JM and Sieber, CC (2008). Sarcopenia and frailty: a clinician's controversial point of view. *Exp Gerontol*, 43 (7), 674-678.
- Baumgartner, RN, Koehler, KM, et al. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol*, 147 (8), 755-763.

- Bautmans, I, Gorus, E, et al. (2007). Handgrip performance in relation to self-perceived fatigue, physical functioning and circulating IL-6 in elderly persons without inflammation. *BMC Geriatr*, 7 5.
- Bean, JF, Kiely, DK, et al. (2007). Is stair climb power a clinically relevant measure of leg power impairments in at-risk older adults? *Arch Phys Med Rehabil*, 88 (5), 604-609.
- Beccafico, S, Puglielli, C, et al. (2007). Age-dependent effects on functional aspects in human satellite cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1100 345-352.
- Beckman, JS, Parks, DA, et al. (1989). A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med*, 6 (6), 607-615.
- Bejma, J and Ji, LL (1999). Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 87 (1), 465-470.
- Berg, HE, Dudley, GA, et al. (1991). Effects of lower limb unloading on skeletal muscle mass and function in humans. *J Appl Physiol*, 70 (4), 1882-1885.
- Berg, HE, Larsson, L, et al. (1997). Lower limb skeletal muscle function after 6 wk of bed rest. *J Appl Physiol*, 82 (1), 182-188.
- Berg, HE and Tesch, PA (1996). Changes in muscle function in response to 10 days of lower limb unloading in humans. *Acta Physiol Scand*, 157 (1), 63-70.
- Bergeron, R, Ren, JM, et al. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281 (6), E1340-1346.
- Berkes, CA and Tapscott, SJ (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 16 (4-5), 585-595.
- Betters, JL, Criswell, DS, et al. (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (11), 1179-1184.
- Betters, JL, Lira, VA, et al. (2008). Supplemental nitric oxide augments satellite cell activity on cultured myofibers from aged mice. *Exp Gerontol*, 43 (12), 1094-1101.
- Bohr, VA, Stevnsner, T, et al. (2002). Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286 (1), 127-134.
- Bonetto, A, Penna, F, et al. (2009). Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med*, 47 (7), 906-916.
- Borina, E, Pellegrino, MA, et al. (2010). Myosin and actin content of human skeletal muscle fibers following 35 days bed rest. *Scand J Med Sci Sports*, 20 (1), 65-73.
- Bota, DA and Davies, KJ (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol*, 4 (9), 674-680.
- Bota, DA, Van Remmen, H, et al. (2002). Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett*, 532 (1-2), 103-106.
- Boveris, A and Chance, B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134 (3), 707-716.
- Brack, AS, Bildsoe, H, et al. (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci*, 118 (Pt 20), 4813-4821.
- Brault, JJ, Jespersen, JG, et al. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem*, 285 (25), 19460-19471.
- Brooks, SV and Faulkner, JA (1988). Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol*, 404 71-82.
- Brooks, SV and Faulkner, JA (1996). The magnitude of the initial injury induced by stretches of maximally activated muscle fibres of mice and rats increases in old age. *J Physiol*, 497 (Pt 2) 573-580.
- Brunk, UT and Terman, A (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem*, 269 (8), 1996-2002.

- Bua, E, Johnson, J, et al. (2006). Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet*, 79 (3), 469-480.
- Bua, EA, McKiernan, SH, et al. (2002). Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J Appl Physiol*, 92 (6), 2617-2624.
- Buford, TW, Anton, SD, et al. (2010a). Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. *Ageing Res Rev*, 9 (4), 369-383.
- Buford, TW, Cooke, MB, et al. (2010b). Effects of age and sedentary lifestyle on skeletal muscle NF-kappaB signaling in men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65 (5), 532-537.
- Cabane, C, Englaro, W, et al. (2003). Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (3), C658-666.
- Cai, D, Frantz, JD, et al. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, 119 (2), 285-298.
- Canto, C, Gerhart-Hines, Z, et al. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458 (7241), 1056-1060.
- Cao, W, Daniel, KW, et al. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*, 24 (7), 3057-3067.
- Cao, Z, Wanagat, J, et al. (2001). Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. *Nucleic Acids Res*, 29 (21), 4502-4508.
- Capel, F, Buffiere, C, et al. (2004). Differential variation of mitochondrial H2O2 release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mech Ageing Dev*, 125 (5), 367-373.
- Capel, F, Rimbart, V, et al. (2005). Due to reverse electron transfer, mitochondrial H2O2 release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech Ageing Dev*, 126 (4), 505-511.
- Carlson, BM and Faulkner, JA (1989). Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol*, 256 (6 Pt 1), C1262-1266.
- Carlson, ME and Conboy, IM (2007). Regulating the Notch pathway in embryonic, adult and old stem cells. *Curr Opin Pharmacol*, 7 (3), 303-309.
- Carlson, ME, Suetta, C, et al. (2009). Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol Med*, 1 (8-9), 381-391.
- Caron, AZ, Drouin, G, et al. (2009). A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol*, 106 (6), 2049-2059.
- Carosio, S, Berardinelli, MG, et al. (2009). Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*,
- Cesari, M, Kritchevsky, SB, et al. (2009). Added value of physical performance measures in predicting adverse health-related events: results from the Health, Aging And Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc*, 57 (2), 251-259.
- Chabi, B, Ljubicic, V, et al. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*, 7 (1), 2-12.
- Charge, SB and Rudnicki, MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84 (1), 209-238.
- Cheek, DB (1985). The control of cell mass and replication. The DNA unit--a personal 20-year study. *Early Hum Dev*, 12 (3), 211-239.
- Chen, CN, Brown-Borg, HM, et al. (2010). Aging impairs the expression of the catalytic subunit of glutamate cysteine ligase in soleus muscle under stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65 (2), 129-137.
- Chen, CN, Brown-Borg, HM, et al. (2008). Muscle disuse: adaptation of antioxidant systems is age dependent. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (5), 461-466.
- Chien, MY, Huang, TY, et al. (2008). Prevalence of sarcopenia estimated using a bioelectrical impedance analysis prediction equation in community-dwelling elderly people in Taiwan. *J Am Geriatr Soc*, 56 (9), 1710-1715.

- Childs, TE, Spangenburg, EE, et al. (2003). Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285 (2), C391-398.
- Chinsomboon, J, Ruas, J, et al. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (50), 21401-21406.
- Choi, TG, Lee, J, et al. (2011). Apoptosis signal-regulating kinase 1 is an intracellular inducer of p38 MAPK-mediated myogenic signalling in cardiac myoblasts. *Biochim Biophys Acta*,
- Chopard, A, Pons, F, et al. (2001). Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in a fast and slow rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280 (2), R323-330.
- Clark, BC and Manini, TM (2008). Sarcopenia \neq dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (8), 829-834.
- Clark, BC and Manini, TM (2010). Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13 (3), 271-276.
- Clarke, BA, Drujan, D, et al. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, 6 (5), 376-385.
- Clavel, S, Coldefy, AS, et al. (2006). Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev*, 127 (10), 794-801.
- Coggan, AR, Spina, RJ, et al. (1992). Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. *J Gerontol*, 47 (3), B71-76.
- Combaret, L, Dardevet, D, et al. (2009). Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12 (1), 37-41.
- Conboy, IM, Conboy, MJ, et al. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 302 (5650), 1575-1577.
- Conboy, IM, Conboy, MJ, et al. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433 (7027), 760-764.
- Conley, KE, Marcinek, DJ, et al. (2007). Mitochondrial dysfunction and age. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10 (6), 688-692.
- Cruz-Jentoft, AJ, Baeyens, JP, et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39 (4), 412-423.
- Cuervo, AM, Bergamini, E, et al. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy*, 1 (3), 131-140.
- Cuervo, AM and Dice, JF (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem*, 275 (40), 31505-31513.
- Cuthbertson, D, Smith, K, et al. (2005). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J*, 19 (3), 422-424.
- Danial, NN and Korsmeyer, SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.
- Davies, KJ and Delsignore, ME (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem*, 262 (20), 9908-9913.
- Davies, KJ, Packer, L, et al. (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys*, 209 (2), 539-554.
- Davies, KJ, Quintanilha, AT, et al. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107 (4), 1198-1205.
- de la Serna, IL, Ohkawa, Y, et al. (2005). MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Mol Cell Biol*, 25 (10), 3997-4009.
- Dedkov, EI, Borisov, AB, et al. (2003). Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem*, 51 (7), 853-863.
- Degens, H, Kosar, SN, et al. (2008). The time course of denervation-induced changes is similar in soleus muscles of adult and old rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33 (2), 299-308.

- Delmonico, MJ, Harris, TB, et al. (2007). Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J Am Geriatr Soc*, 55 (5), 769-774.
- Deschenes, MR, Holdren, AN, et al. (2008). Adaptations to short-term muscle unloading in young and aged men. *Med Sci Sports Exerc*, 40 (5), 856-863.
- Dignam, JD, Lebovitz, RM, et al. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11 (5), 1475-1489.
- Dirks, AJ, Hofer, T, et al. (2006). Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res Rev*, 5 (2), 179-195.
- Dirks, AJ and Leeuwenburgh, C (2004). Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med*, 36 (1), 27-39.
- Doherty, TJ (2003). Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol*, 95 (4), 1717-1727.
- Doherty, TJ, Vandervoort, AA, et al. (1993). Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Can J Appl Physiol*, 18 (4), 331-358.
- Dolado, I, Swat, A, et al. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11 (2), 191-205.
- Drew, B, Phaneuf, S, et al. (2003). Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284 (2), R474-480.
- Dreyer, HC, Blanco, CE, et al. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve*, 33 (2), 242-253.
- Drummond, MJ, Dreyer, HC, et al. (2008). Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol*, 104 (5), 1452-1461.
- Dupont-Versteegden, EE (2005). Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol*, 40 (6), 473-481.
- Edstrom, E, Altun, M, et al. (2007). Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol Behav*, 92 (1-2), 129-135.
- Edstrom, E and Ulfhake, B (2005). Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*, 4 (2), 65-77.
- Edwards, RH, Young, A, et al. (1977). Human skeletal muscle function: description of tests and normal values. *Clin Sci Mol Med*, 52 (3), 283-290.
- Emerich, DF, Thanos, CG, et al. (2008). Intraventricular implant of encapsulated CNTF-secreting fibroblasts ameliorates motor deficits in aged rats. *Curr Aging Sci*, 1 (2), 105-111.
- Essen-Gustavsson, B and Borges, O (1986). Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand*, 126 (1), 107-114.
- Evans, MJ and Scarpulla, RC (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*, 264 (24), 14361-14368.
- Fano, G, Mecocci, P, et al. (2001). Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 22 (4), 345-351.
- Farthing, JP, Krentz, JR, et al. (2009). Strength training the free limb attenuates strength loss during unilateral immobilization. *J Appl Physiol*, 106 (3), 830-836.
- Favier, A (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Bio Clin*, 55 9-16.
- Feng, J, Xie, H, et al. (2008). Quantitative proteomic profiling of muscle type-dependent and age-dependent protein carbonylation in rat skeletal muscle mitochondria. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (11), 1137-1152.
- Fernandez-Celemin, L, Pasko, N, et al. (2002). Inhibition of muscle insulin-like growth factor I expression by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283 (6), E1279-1290.

- Ferretti, G, Antonutto, G, et al. (1997). The interplay of central and peripheral factors in limiting maximal O₂ consumption in man after prolonged bed rest. *J Physiol*, 501 (Pt 3) 677-686.
- Fiatarone, MA, O'Neill, EF, et al. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*, 330 (25), 1769-1775.
- Figueiredo, PA, Powers, SK, et al. (2009). Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64 (9), 927-939.
- Fitts, RH, Romatowski, JG, et al. (2000). Effect of spaceflight on the maximal shortening velocity, morphology, and enzyme profile of fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers in rhesus monkeys. *J Gravit Physiol*, 7 (1), S37-38.
- Flach, RJ and Bennett, AM (2010). MAP kinase phosphatase-1--a new player at the nexus between sarcopenia and metabolic disease. *Aging (Albany NY)*, 2 (3), 170-176.
- Foletta, VC, White, LJ, et al. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch*, 461 (3), 325-335.
- Fried, LP, Tangen, CM, et al. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56 (3), M146-156.
- Frontera, WR, Hughes, VA, et al. (2000a). Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol*, 88 (4), 1321-1326.
- Frontera, WR, Suh, D, et al. (2000b). Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279 (3), C611-618.
- Fugere, NA, Ferrington, DA, et al. (2006). Protein nitration with aging in the rat semimembranosus and soleus muscles. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61 (8), 806-812.
- Fujita, S, Glynn, EL, et al. (2009). Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia*, 52 (9), 1889-1898.
- Fulle, S, Di Donna, S, et al. (2005). Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells. *Exp Gerontol*, 40 (3), 189-197.
- Funato, K, Matsuo, A, et al. (1997). Changes in force-velocity and power output of upper and lower extremity musculature in young subjects following 20 days bed rest. *J Gravit Physiol*, 4 (1), S22-30.
- Gabai, VL, Meriin, AB, et al. (2000). Suppression of stress kinase JNK is involved in HSP72-mediated protection of myogenic cells from transient energy deprivation. HSP72 alleviates the stress-induced inhibition of JNK dephosphorylation. *J Biol Chem*, 275 (48), 38088-38094.
- Gallegly, JC, Turesky, NA, et al. (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol*, 97 (3), 1082-1090.
- Gerhart-Hines, Z, Rodgers, JT, et al. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J*, 26 (7), 1913-1923.
- Gianni, P, Jan, KJ, et al. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 39 (9), 1391-1400.
- Gill, TM, Baker, DI, et al. (2002). A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home. *N Engl J Med*, 347 (14), 1068-1074.
- Gill, TM, Gahbauer, EA, et al. (2010). Trajectories of disability in the last year of life. *N Engl J Med*, 362 (13), 1173-1180.
- Goettl, VM, Wemlinger, TA, et al. (2001). Motoric behavior in aged rats treated with GM1. *Brain Res*, 906 (1-2), 92-100.
- Gomez-Cabrera, MC, Borrás, C, et al. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567 (Pt 1), 113-120.
- Gomez-Cabrera, MC, Close, GL, et al. (2010). Effect of xanthine oxidase-generated extracellular superoxide on skeletal muscle force generation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 298 (1), R2-8.
- Gomez-Cabrera, MC, Domenech, E, et al. (2008a). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, 87 (1), 142-149.

- Gomez-Cabrera, MC, Domenech, E, et al. (2008b). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44 (2), 126-131.
- Gomez-Cabrera, MC, Martinez, A, et al. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr*, 96 Suppl 1 S31-33.
- Gomez-Cabrera, MC, Pallardo, FV, et al. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA*, 289 (19), 2503-2504.
- Gonzalez, E, Messi, ML, et al. (2000). The specific force of single intact extensor digitorum longus and soleus mouse muscle fibers declines with aging. *J Membr Biol*, 178 (3), 175-183.
- Goodpaster, BH, Carlson, CL, et al. (2001). Attenuation of skeletal muscle and strength in the elderly: The Health ABC Study. *J Appl Physiol*, 90 (6), 2157-2165.
- Goodpaster, BH, Park, SW, et al. (2006). The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61 (10), 1059-1064.
- Grune, T, Merker, K, et al. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 305 (3), 709-718.
- Guillet, C, Prod'homme, M, et al. (2004). Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J*, 18 (13), 1586-1587.
- Gunduz, F, Senturk, UK, et al. (2004). The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol Res*, 53 (2), 171-176.
- Gupte, AA, Bomhoff, GL, et al. (2008). Age-related differences in skeletal muscle insulin signaling: the role of stress kinases and heat shock proteins. *J Appl Physiol*, 105 (3), 839-848.
- Guralnik, JM, Ferrucci, L, et al. (2000). Lower extremity function and subsequent disability: consistency across studies, predictive models, and value of gait speed alone compared with the short physical performance battery. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55 (4), M221-231.
- Guralnik, JM, Simonsick, EM, et al. (1994). A short physical performance battery assessing lower extremity function: association with self-reported disability and prediction of mortality and nursing home admission. *J Gerontol*, 49 (2), M85-94.
- Guttridge, DC, Albanese, C, et al. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 19 (8), 5785-5799.
- Haddad, F and Adams, GR (2006). Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*, 100 (4), 1188-1203.
- Haddad, F, Adams, GR, et al. (2006). Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J Appl Physiol*, 100 (2), 433-441.
- Hagen, TM, Yowe, DL, et al. (1997). Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (7), 3064-3069.
- Hakkinen, K (1995). Neuromuscular fatigue and recovery in women at different ages during heavy resistance loading. *Electromyogr Clin Neurophysiol*, 35 (7), 403-413.
- Hall, JK, Banks, GB, et al. (2010). Prevention of muscle aging by myofiber-associated satellite cell transplantation. *Sci Transl Med*, 2 (57), 57ra83.
- Halliwell, B and Gutteridge, J (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Oxford University Press.
- Hameed, M, Orrell, RW, et al. (2003). Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol*, 547 (Pt 1), 247-254.
- Hamilton, KL, Staib, JL, et al. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 34 (7), 800-809.
- Hamilton, ML, Van Remmen, H, et al. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (18), 10469-10474.
- Handschin, C, Chin, S, et al. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*, 282 (41), 30014-30021.

- Handschin, C, Rhee, J, et al. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12), 7111-7116.
- Hansen, JM, Klass, M, et al. (2007a). A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle. *Cell Biol Int*, 31 (6), 546-553.
- Hansen, RE, Ostergaard, H, et al. (2007b). Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Biochem*, 363 (1), 77-82.
- Harman, D (1956a). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11 (3), 298-300.
- Harman, D (1956b). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol*, 11 298-300.
- Harman, D (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 20 (4), 145-147.
- Hartmann, A, Knols, R, et al. (2009). Reproducibility of an isokinetic strength-testing protocol of the knee and ankle in older adults. *Gerontology*, 55 (3), 259-268.
- Hawke, TJ and Garry, DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91 (2), 534-551.
- Hayden, MS and Ghosh, S (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, 18 (18), 2195-2224.
- Hayden, MS and Ghosh, S (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132 (3), 344-362.
- Hellsten, Y, Ahlborg, G, et al. (1988). Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand*, 134 (1), 159-160.
- Hellsten, Y, Frandsen, U, et al. (1997). Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *J Physiol*, 498 (Pt 1) 239-248.
- Hepple, RT, Qin, M, et al. (2008). Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: implications for sarcopenia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295 (4), R1231-1237.
- Hikida, RS, Staron, RS, et al. (2000). Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. II. Muscle fiber characteristics and nucleo-cytoplasmic relationships. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55 (7), B347-354.
- Ho, RC, Hirshman, MF, et al. (2005). Regulation of IkappaB kinase and NF-kappaB in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289 (4), C794-801.
- Hofer, T, Marzetti, E, et al. (2008). Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp Gerontol*, 43 (6), 563-570.
- Hollander, J, Bejma, J, et al. (2000). Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. *Mech Ageing Dev*, 116 (1), 33-45.
- Holloszy, JO and Booth, FW (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol*, 38 273-291.
- Homma, T, Hamaoka, T, et al. (2009). Low-volume muscle endurance training prevents decrease in muscle oxidative and endurance function during 21-day forearm immobilization. *Acta Physiol (Oxf)*, 197 (4), 313-320.
- Hood, DA (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 90 (3), 1137-1157.
- Hood, DA, Irrcher, I, et al. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol*, 209 (Pt 12), 2265-2275.
- Hopp, JF (1993). Effects of age and resistance training on skeletal muscle: a review. *Phys Ther*, 73 (6), 361-373.
- Hsieh, CC and Papaconstantinou, J (2006). Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. *FASEB J*, 20 (2), 259-268.
- Huang, JH and Hood, DA (2009). Age-associated mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: Contributing factors and suggestions for long-term interventions. *IUBMB Life*, 61 (3), 201-214.

-
- Hughes, VA, Frontera, WR, et al. (2001). Longitudinal muscle strength changes in older adults: influence of muscle mass, physical activity, and health. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56 (5), B209-217.
- Hunter, RB and Kandarian, SC (2004). Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest*, 114 (10), 1504-1511.
- Hunter, RB, Stevenson, E, et al. (2002). Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J*, 16 (6), 529-538.
- Hunter, SK, Critchlow, A, et al. (2005). Muscle endurance is greater for old men compared with strength-matched young men. *J Appl Physiol*, 99 (3), 890-897.
- Huss, JM, Kopp, RP, et al. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem*, 277 (43), 40265-40274.
- Iannuzzi-Sucich, M, Prestwood, KM, et al. (2002). Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57 (12), M772-777.
- Ibrahim, B and Stoward, PJ (1978). The histochemical localization of xanthine oxidase. *Histochem J*, 10 (5), 615-617.
- Ichijo, H, Nishida, E, et al. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 275 (5296), 90-94.
- Ikemoto, M, Okamura, Y, et al. (2002). A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*, 21 (5), 257-263.
- Irrcher, I, Adhihetty, PJ, et al. (2003). PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (6), C1669-1677.
- Irrcher, I, Ljubicic, V, et al. (2009). Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296 (1), C116-123.
- Irrcher, I, Ljubicic, V, et al. (2008). AMP-activated protein kinase-regulated activation of the PGC-1alpha promoter in skeletal muscle cells. *PLoS One*, 3 (10), e3614.
- Ivey, FM, Tracy, BL, et al. (2000). Effects of strength training and detraining on muscle quality: age and gender comparisons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55 (3), B152-157; discussion B158-159.
- Izquierdo, M, Hakkinen, K, et al. (2001). Maximal strength and power, endurance performance, and serum hormones in middle-aged and elderly men. *Med Sci Sports Exerc*, 33 (9), 1577-1587.
- Izyumov, DS, Avetisyan, AV, et al. (2004). "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1658 (1-2), 141-147.
- Jackson, JR, Ryan, MJ, et al. (2010). Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299 (6), R1572-1581.
- Jager, S, Handschin, C, et al. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (29), 12017-12022.
- Janssen, I, Heymsfield, SB, et al. (2000). Estimation of skeletal muscle mass by bioelectrical impedance analysis. *J Appl Physiol*, 89 (2), 465-471.
- Jejurikar, SS and Kuzon, WM, Jr. (2003). Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*, 8 (6), 573-578.
- Jenning, EH, Schoonjans, K, et al. (2010). Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene*, 29 (33), 4617-4624.
- Ji, LL (2001). Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*, 928 236-247.
-

- Ji, LL, Dillon, D, et al. (1990). Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol*, 258 (4 Pt 2), R918-923.
- Ji, LL, Gomez-Cabrera, MC, et al. (2004). Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J*, 18 (13), 1499-1506.
- Jijon, H, Allard, B, et al. (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cell Signal*, 16 (9), 1023-1032.
- Jimenez-Moreno, R, Wang, ZM, et al. (2008). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release declines in muscle fibers from aging mice. *Biophys J*, 94 (8), 3178-3188.
- Johnson, JE, Mehler, WR, et al. (1975). A fine structural study of degenerative changes in the dorsal column nuclei of aging mice. Lack of protection by vitamin E. *J Gerontol*, 30 (4), 395-411.
- Jones, DP (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10), 1865-1879.
- Jones, SW, Hill, RJ, et al. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J*, 18 (9), 1025-1027.
- Jorgensen, SB, Wojtaszewski, JF, et al. (2005). Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J*, 19 (9), 1146-1148.
- Joseph, JA, Bartus, RT, et al. (1983). Psychomotor performance in the senescent rodent: reduction of deficits via striatal dopamine receptor up-regulation. *Neurobiol Aging*, 4 (4), 313-319.
- Joulia, D, Bernardi, H, et al. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res*, 286 (2), 263-275.
- Judge, AR, Koncarevic, A, et al. (2007). Role for IkappaBalpha, but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292 (1), C372-382.
- Judge, S, Jang, YM, et al. (2005). Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289 (6), R1564-1572.
- Jung, T, Bader, N, et al. (2007). Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys*, 462 (2), 231-237.
- Kadi, F, Charifi, N, et al. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve*, 29 (1), 120-127.
- Kandarian, SC and Jackman, RW (2006). Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve*, 33 (2), 155-165.
- Kang, C, O'Moore, KM, et al. (2009). Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med*, 47 (10), 1394-1400.
- Kang, D, Kim, SH, et al. (2007). Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*, 7 (1-2), 39-44.
- Kavazis, AN, Talbert, EE, et al. (2009). Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med*, 46 (6), 842-850.
- Kawakami, Y, Muraoka, Y, et al. (2000). Changes in muscle size and architecture following 20 days of bed rest. *J Gravit Physiol*, 7 (3), 53-59.
- Kawano, F, Takeno, Y, et al. (2008). Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295 (2), C458-467.
- Kedar, V, McDonough, H, et al. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (52), 18135-18140.
- Kefaloyianni, E, Gaitanaki, C, et al. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 18 (12), 2238-2251.
- Kelly, DP (2011). Cell Biology: Ageing theories unified. *Nature* 470 342-343.
- Kent-Braun, JA and Ng, AV (1999). Specific strength and voluntary muscle activation in young and elderly women and men. *J Appl Physiol*, 87 (1), 22-29.

-
- Kerr, JF, Wyllie, AH, et al. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4), 239-257.
- Kim, GY, Mercer, SE, et al. (2002). The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem*, 277 (33), 29792-29802.
- Kim, JH, Kwak, HB, et al. (2008). Lifelong exercise and mild (8%) caloric restriction attenuate age-induced alterations in plantaris muscle morphology, oxidative stress and IGF-1 in the Fischer-344 rat. *Exp Gerontol*, 43 (4), 317-329.
- Klein, AS, Joh, JW, et al. (1996). Allopurinol: discrimination of antioxidant from enzyme inhibitory activities. *Free Radic Biol Med*, 21 (5), 713-717.
- Klitgaard, H, Mantoni, M, et al. (1990). Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: a cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds. *Acta Physiol Scand*, 140 (1), 41-54.
- Koesterer, TJ, Dodd, SL, et al. (2002). Increased antioxidant capacity does not attenuate muscle atrophy caused by unweighting. *J Appl Physiol*, 93 (6), 1959-1965.
- Koltai, E, Szabo, Z, et al. (2010). Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev*, 131 (1), 21-28.
- Kondo, H, Kodama, J, et al. (1993a). Oxidative stress during recovery from muscle atrophy. *FEBS Lett*, 326 (1-3), 189-191.
- Kondo, H, Miura, M, et al. (1993b). Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Pflugers Arch*, 422 (4), 404-406.
- Kondo, H, Miura, M, et al. (1992). Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 262 (5 Pt 1), E583-590.
- Kondo, H, Nakagaki, I, et al. (1993c). Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol*, 265 (6 Pt 1), E839-844.
- Koulmann, N, Bahi, L, et al. (2008). Thyroid hormone is required for the phenotype transitions induced by the pharmacological inhibition of calcineurin in adult soleus muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (1), E69-77.
- Krawiec, BJ, Frost, RA, et al. (2005). Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289 (6), E969-980.
- Kujoth, GC, Hiona, A, et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309 (5733), 481-484.
- Kumar, A, Takada, Y, et al. (2004). Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med*, 82 (7), 434-448.
- Kusuhara, K, Madsen, K, et al. (2007). Calcium signalling in the regulation of PGC-1alpha, PDK4 and HKII mRNA expression. *Biol Chem*, 388 (5), 481-488.
- Kyriakis, JM and Avruch, J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81 (2), 807-869.
- Lambertucci, RH, Levada-Pires, AC, et al. (2007). Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats. *Mech Ageing Dev*, 128 (3), 267-275.
- Langen, RC, Schols, AM, et al. (2001). Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J*, 15 (7), 1169-1180.
- Langen, RC, Van Der Velden, JL, et al. (2004). Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J*, 18 (2), 227-237.
- Langley, B, Thomas, M, et al. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*, 277 (51), 49831-49840.
- Lanza, IR, Russ, DW, et al. (2004). Age-related enhancement of fatigue resistance is evident in men during both isometric and dynamic tasks. *J Appl Physiol*, 97 (3), 967-975.
- Larsson, L and Edstrom, L (1986). Effects of age on enzyme-histochemical fibre spectra and contractile properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat. *J Neurol Sci*, 76 (1), 69-89.
-

-
- Larsson, L, Grimby, G, et al. (1979). Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J Appl Physiol*, 46 (3), 451-456.
- Larsson, L, Sjödin, B, et al. (1978). Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22--65 years. *Acta Physiol Scand*, 103 (1), 31-39.
- Lauretani, F, Russo, CR, et al. (2003). Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol*, 95 (5), 1851-1860.
- Lawler, JM, Cline, CC, et al. (1997). Effect of oxidative stress and acidosis on diaphragm contractile function. *Am J Physiol*, 273 (2 Pt 2), R630-636.
- Lawler, JM and Hindle, A (2011). Living in a Box or Call of the Wild? Revisiting Lifetime Inactivity and Sarcopenia. *Antioxid Redox Signal*,
- Lawler, JM, Powers, SK, et al. (1993). Acute exercise and skeletal muscle antioxidant and metabolic enzymes: effects of fiber type and age. *Am J Physiol*, 265 (6 Pt 2), R1344-1350.
- Lawler, JM, Song, W, et al. (2003). Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 35 (1), 9-16.
- Le Grand, F and Rudnicki, MA (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 19 (6), 628-633.
- LeBlanc, AD, Schneider, VS, et al. (1992). Regional changes in muscle mass following 17 weeks of bed rest. *J Appl Physiol*, 73 (5), 2172-2178.
- Lecker, SH, Solomon, V, et al. (1999). Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 129 (1S Suppl), 227S-237S.
- Lee, CE, McArdle, A, et al. (2007). The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin Nutr*, 26 (5), 524-534.
- Lee, CM, Lopez, ME, et al. (1998). Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy. *Free Radic Biol Med*, 25 (8), 964-972.
- Lees, SJ, Rathbone, CR, et al. (2006). Age-associated decrease in muscle precursor cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290 (2), C609-615.
- Leeuwenburgh, C, Fiebig, R, et al. (1994). Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol*, 267 (2 Pt 2), R439-445.
- Leick, L, Fentz, J, et al. (2010a). PGC-1{alpha} is required for AICAR-induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299 (3), E456-465.
- Leick, L, Lyngby, SS, et al. (2010b). PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 45 (5), 336-342.
- Leick, L, Lyngby, SS, et al. (2010c). PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 45 (5), 336-342.
- Leick, L, Wojtaszewski, JF, et al. (2008a). PGC-1{alpha} is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2), E463-474.
- Leick, L, Wojtaszewski, JF, et al. (2008b). PGC-1alpha is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (2), E463-474.
- Leiter, JR and Anderson, JE (2010). Satellite cells are increasingly refractory to activation by nitric oxide and stretch in aged mouse-muscle cultures. *Int J Biochem Cell Biol*, 42 (1), 132-136.
- Lemasters, JJ (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*, 8 (1), 3-5.
- Levine, B and Klionsky, DJ (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6 (4), 463-477.
- Lewandoski, M, Wassarman, KM, et al. (1997). Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr Biol*, 7 (2), 148-151.
-

-
- Lexell, J (1995). Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 50 Spec No 11-16.
- Lexell, J and Downham, D (1992). What determines the muscle cross-sectional area? *J Neurol Sci*, 111 (1), 113-114.
- Lexell, J, Taylor, CC, et al. (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci*, 84 (2-3), 275-294.
- Li, H, Malhotra, S, et al. (2008). Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med*, 86 (10), 1113-1126.
- Li, HH, Kedar, V, et al. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest*, 114 (8), 1058-1071.
- Li, YP, Atkins, CM, et al. (1999). Mitochondria mediate tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal*, 1 (1), 97-104.
- Li, YP, Chen, Y, et al. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*, 19 (3), 362-370.
- Li, YP, Chen, Y, et al. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285 (4), C806-812.
- Li, YP, Schwartz, RJ, et al. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J*, 12 (10), 871-880.
- Lin, J, Handschin, C, et al. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1 (6), 361-370.
- Lin, J, Puigserver, P, et al. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*, 277 (3), 1645-1648.
- Lin, J, Wu, PH, et al. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*, 119 (1), 121-135.
- Lindstrom, B, Lexell, J, et al. (1997). Skeletal muscle fatigue and endurance in young and old men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 52 (1), B59-66.
- Ling, C, Poulsen, P, et al. (2004). Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *J Clin Invest*, 114 (10), 1518-1526.
- Little, JP, Safdar, A, et al. (2011). An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1{alpha} and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,
- Ljubcic, V and Hood, DA (2009). Diminished contraction-induced intracellular signaling towards mitochondrial biogenesis in aged skeletal muscle. *Aging Cell*, 8 (4), 394-404.
- Ljubcic, V, Joseph, AM, et al. (2009). Molecular basis for an attenuated mitochondrial adaptive plasticity in aged skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 1 (9), 818-830.
- Llovera, M, Garcia-Martinez, C, et al. (1997). TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, 230 (2), 238-241.
- Lluis, F, Ballestar, E, et al. (2005). E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J*, 24 (5), 974-984.
- Lluis, F, Perdiguero, E, et al. (2006). Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends Cell Biol*, 16 (1), 36-44.
- Lowe, DA, Surek, JT, et al. (2001). Electron paramagnetic resonance reveals age-related myosin structural changes in rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280 (3), C540-547.
- Lowe, DA, Warren, GL, et al. (2004). Muscle activity and aging affect myosin structural distribution and force generation in rat fibers. *J Appl Physiol*, 96 (2), 498-506.
-

- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 (1), 265-275.
- Lyamzaev, KG, Izyumov, DS, et al. (2004). Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis. *Acta Biochim Pol*, 51 (2), 553-562.
- Lynch, GS (2001). Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders. *Exerc Sport Sci Rev*, 29 (4), 141-148.
- Lynch, NA, Metter, EJ, et al. (1999). Muscle quality. I. Age-associated differences between arm and leg muscle groups. *J Appl Physiol*, 86 (1), 188-194.
- Mackey, AL, Esmarck, B, et al. (2007). Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. *Scand J Med Sci Sports*, 17 (1), 34-42.
- Mador, MJ and Bozkanat, E (2001). Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2 (4), 216-224.
- Madrid, LV, Wang, CY, et al. (2000). Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, 20 (5), 1626-1638.
- Manton, KG and Vaupel, JW (1995). Survival after the age of 80 in the United States, Sweden, France, England, and Japan. *N Engl J Med*, 333 (18), 1232-1235.
- Martin, B, Ji, S, et al. (2010). "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (14), 6127-6133.
- Marzani, B, Felzani, G, et al. (2005). Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles. *Exp Gerontol*, 40 (12), 959-965.
- Marzetti, E, Hwang, JC, et al. (2010). Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1800 (3), 235-244.
- Marzetti, E, Lawler, JM, et al. (2008a). Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 44 (2), 160-168.
- Marzetti, E, Wohlgemuth, SE, et al. (2008b). Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev*, 129 (9), 542-549.
- Mathias, S, Nayak, US, et al. (1986). Balance in elderly patients: the "get-up and go" test. *Arch Phys Med Rehabil*, 67 (6), 387-389.
- Matsuba, Y, Goto, K, et al. (2009). Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol (Oxf)*, 196 (3), 329-339.
- Matsukawa, J, Matsuzawa, A, et al. (2004). The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem*, 136 (3), 261-265.
- Matsushima, Y, Nanri, H, et al. (2006). Hindlimb unloading decreases thioredoxin-related antioxidant proteins and increases thioredoxin-binding protein-2 in rat skeletal muscle. *Free Radic Res*, 40 (7), 715-722.
- Matuszczak, Y, Arbogast, S, et al. (2004). Allopurinol mitigates muscle contractile dysfunction caused by hindlimb unloading in mice. *Aviat Space Environ Med*, 75 (7), 581-588.
- Mauro, A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9 493-495.
- Mazzatti, DJ, Smith, MA, et al. (2008). Muscle unloading-induced metabolic remodeling is associated with acute alterations in PPARdelta and UCP-3 expression. *Physiol Genomics*, 34 (2), 149-161.
- McCarty, MF, Barroso-Aranda, J, et al. (2009). The "rejuvenatory" impact of lipoic acid on mitochondrial function in aging rats may reflect induction and activation of PPAR-gamma coactivator-1alpha. *Med Hypotheses*, 72 (1), 29-33.
- McClung, JM, Judge, AR, et al. (2010). p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298 (3), C542-549.
- McCord, JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 312 (3), 159-163.
- McDonagh, MJ, White, MJ, et al. (1984). Different effects of ageing on the mechanical properties of human arm and leg muscles. *Gerontology*, 30 (1), 49-54.

-
- McKiernan, SH, Colman, RJ, et al. (2010). Caloric restriction delays aging-induced cellular phenotypes in rhesus monkey skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 46 (1), 23-29.
- McNeil, CJ and Rice, CL (2007). Fatigability is increased with age during velocity-dependent contractions of the dorsiflexors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62 (6), 624-629.
- Mecocci, P, Fano, G, et al. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 26 (3-4), 303-308.
- Miller, TA, Lesniewski, LA, et al. (2001). Hindlimb unloading induces a collagen isoform shift in the soleus muscle of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (5), R1710-1717.
- Miquel, J (1992). An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res*, 275 (3-6), 209-216.
- Miquel, J, Economos, AC, et al. (1980). Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*, 15 (6), 575-591.
- Miura, S, Kawanaka, K, et al. (2007). An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation. *Endocrinology*, 148 (7), 3441-3448.
- Moorhouse, PC, Grootveld, M, et al. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett*, 213 (1), 23-28.
- Morey-Holton, ER and Globus, RK (2002). Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol*, 92 (4), 1367-1377.
- Moriwaki, Y, Yamamoto, T, et al. (1996). Immunohistochemical localization of aldehyde and xanthine oxidase in rat tissues using polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol*, 105 (1), 71-79.
- Morton, JP, Holloway, K, et al. (2009). Exercise training-induced gender-specific heat shock protein adaptations in human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 39 (2), 230-233.
- Mosoni, L, Breuille, D, et al. (2004). Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp Gerontol*, 39 (2), 203-210.
- Mourkioti, F, Kratsios, P, et al. (2006). Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest*, 116 (11), 2945-2954.
- Mozdziak, PE, Truong, Q, et al. (1998). Hindlimb suspension reduces muscle regeneration. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 78 (2), 136-140.
- Murlasits, Z, Cutlip, RG, et al. (2006). Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp Gerontol*, 41 (4), 398-406.
- Murray, MP, Duthie, EH, Jr., et al. (1985). Age-related differences in knee muscle strength in normal women. *J Gerontol*, 40 (3), 275-280.
- Murray, MP, Gardner, GM, et al. (1980). Strength of isometric and isokinetic contractions: knee muscles of men aged 20 to 86. *Phys Ther*, 60 (4), 412-419.
- Musaro, A, Cusella De Angelis, MG, et al. (1995). Enhanced expression of myogenic regulatory genes in aging skeletal muscle. *Exp Cell Res*, 221 (1), 241-248.
- Mylabathula, DB, Rice, KM, et al. (2006). Age-associated changes in MAPK activation in fast- and slow-twitch skeletal muscle of the F344/NNiaHSD X Brown Norway/BiNia rat model. *Exp Gerontol*, 41 (2), 205-214.
- Narkar, VA, Downes, M, et al. (2008). AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*, 134 (3), 405-415.
- Nebreda, AR and Porras, A (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, 25 (6), 257-260.
- Neder, JA, Nery, LE, et al. (1999). Reference values for concentric knee isokinetic strength and power in nonathletic men and women from 20 to 80 years old. *J Orthop Sports Phys Ther*, 29 (2), 116-126.
- Nisoli, E, Tonello, C, et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310 (5746), 314-317.
- Nuss, JE, Amaning, JK, et al. (2009). Oxidative modification and aggregation of creatine kinase from aged mouse skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 1 (6), 557-572.
-

- Ogawa, T, Furochi, H, et al. (2006). Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest. *Muscle Nerve*, 34 (4), 463-469.
- Oh-Ishi, S, Kizaki, T, et al. (1995). Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle. *Mech Ageing Dev*, 84 (1), 65-76.
- Oishi, Y, Ogata, T, et al. (2008). Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiol (Oxf)*, 192 (3), 381-395.
- Ojuka, EO, Jones, TE, et al. (2003). Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J*, 17 (6), 675-681.
- Olesen, J, Kiilerich, K, et al. (2010). PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 460 (1), 153-162.
- Oliveira, RL, Ueno, M, et al. (2004). Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287 (4), E686-695.
- Overend, TJ, Cunningham, DA, et al. (1992). Knee extensor and knee flexor strength: cross-sectional area ratios in young and elderly men. *J Gerontol*, 47 (6), M204-210.
- Pacher, P, Nivorozhkin, A, et al. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*, 58 (1), 87-114.
- Palomero, J and Jackson, MJ (2010). Redox regulation in skeletal muscle during contractile activity and aging. *J Anim Sci*, 88 (4), 1307-1313.
- Pansarasa, O, Bertorelli, L, et al. (1999). Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 27 (5-6), 617-622.
- Pansarasa, O, Castagna, L, et al. (2000). Age and sex differences in human skeletal muscle: role of reactive oxygen species. *Free Radic Res*, 33 (3), 287-293.
- Pantano, C, Reynaert, NL, et al. (2006). Redox-sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*, 8 (9-10), 1791-1806.
- Patch, LD and Brooks, GA (1980). Effects of training on VO₂ max and VO₂ during two running intensities in rats. *Pflugers Arch*, 386 (3), 215-219.
- Pavy-Le Traon, A, Heer, M, et al. (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol*, 101 (2), 143-194.
- Payne, AM, Zheng, Z, et al. (2004). External Ca²⁺-dependent excitation-contraction coupling in a population of ageing mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 560 (Pt 1), 137-155.
- Peeters, GM, van Schoor, NM, et al. (2007). Relationship between cortisol and physical performance in older persons. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 67 (3), 398-406.
- Petrella, JK, Kim, JS, et al. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol*, 104 (6), 1736-1742.
- Petrella, JK, Kim, JS, et al. (2005). Age differences in knee extension power, contractile velocity, and fatigability. *J Appl Physiol*, 98 (1), 211-220.
- Petrofsky, JS and Laymon, M (2002). The effect of ageing in spinal cord injured humans on the blood pressure and heart rate responses during fatiguing isometric exercise. *Eur J Appl Physiol*, 86 (6), 479-486.
- Philip, B, Lu, Z, et al. (2005). Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell Signal*, 17 (3), 365-375.
- Phillips, SM, Glover, EI, et al. (2009). Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 107 (3), 645-654.
- Pistilli, EE, Siu, PM, et al. (2006). Molecular regulation of apoptosis in fast plantaris muscles of aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61 (3), 245-255.
- Pluijm, SM, Visser, M, et al. (2007). Unhealthy lifestyles during the life course: association with physical decline in late life. *Aging Clin Exp Res*, 19 (1), 75-83.
- Pogozelski, AR, Geng, T, et al. (2009). p38gamma mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. *PLoS One*, 4 (11), e7934.

-
- Pottle, D and Gosselin, LE (2000). Impact of mechanical load on functional recovery after muscle reloading. *Med Sci Sports Exerc*, 32 (12), 2012-2017.
- Poulin, MJ, Vandervoort, AA, et al. (1992). Eccentric and concentric torques of knee and elbow extension in young and older men. *Can J Sport Sci*, 17 (1), 3-7.
- Powers, SK, Criswell, D, et al. (1994). Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 266 (2 Pt 2), R375-380.
- Powers, SK, Duarte, J, et al. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, 95 (1), 1-9.
- Powers, SK, Kavazis, AN, et al. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (2), R337-344.
- Powers, SK, Kavazis, AN, et al. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 102 (6), 2389-2397.
- Powers, SK, Talbert, EE, et al. (2011). Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*, 589 (Pt 9), 2129-2138.
- Puigserver, P, Adelmant, G, et al. (1999). Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286 (5443), 1368-1371.
- Puigserver, P, Rhee, J, et al. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*, 8 (5), 971-982.
- Puigserver, P and Spiegelman, BM (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*, 24 (1), 78-90.
- Puigserver, P, Wu, Z, et al. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92 (6), 829-839.
- Puri, PL, Wu, Z, et al. (2000). Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev*, 14 (5), 574-584.
- Radak, Z, Naito, H, et al. (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 445 (2), 273-278.
- Reed, DJ, Babson, JR, et al. (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem*, 106 (1), 55-62.
- Reid, MB (2001). Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*, 33 (3), 371-376.
- Reid, MB (2008). Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*, 44 (2), 169-179.
- Reid, MB, Khawli, FA, et al. (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol*, 75 (3), 1081-1087.
- Renault, V, Piron-Hamelin, G, et al. (2000). Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol*, 35 (6-7), 711-719.
- Renault, V, Thornell, LE, et al. (2002). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell*, 1 (2), 132-139.
- Renganathan, M, Messi, ML, et al. (1998). Overexpression of IGF-1 exclusively in skeletal muscle prevents age-related decline in the number of dihydropyridine receptors. *J Biol Chem*, 273 (44), 28845-28851.
- Reznick, RM, Zong, H, et al. (2007). Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*, 5 (2), 151-156.
- Rice, CL, Cunningham, DA, et al. (1989). Arm and leg composition determined by computed tomography in young and elderly men. *Clin Physiol*, 9 (3), 207-220.
- Rieu, I, Magne, H, et al. (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *J Physiol*, 587 (Pt 22), 5483-5492.
-

-
- Riley, DA, Bain, JL, et al. (2005). Skeletal muscle fiber atrophy: altered thin filament density changes slow fiber force and shortening velocity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288 (2), C360-365.
- Ristow, M, Zarse, K, et al. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (21), 8665-8670.
- Rodgers, JT, Lerin, C, et al. (2008). Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett*, 582 (1), 46-53.
- Rohrbach, S, Gruenler, S, et al. (2006). The thioredoxin system in aging muscle: key role of mitochondrial thioredoxin reductase in the protective effects of caloric restriction? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291 (4), R927-935.
- Rolland, Y, Czerwinski, S, et al. (2008). Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J Nutr Health Aging*, 12 (7), 433-450.
- Rolland, Y, Lauwers-Cances, V, et al. (2003). Sarcopenia, calf circumference, and physical function of elderly women: a cross-sectional study. *J Am Geriatr Soc*, 51 (8), 1120-1124.
- Romagnoli, M, Gomez-Cabrera, MC, et al. (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic Biol Med*, 49 (2), 171-177.
- Rosa, EF, Silva, AC, et al. (2005). Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. *J Appl Physiol*, 99 (4), 1569-1575.
- Rosenberg, IH (1997). Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr*, 127 (5 Suppl), 990S-991S.
- Rossi, P, Marzani, B, et al. (2008). Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr Aging Sci*, 1 (3), 182-191.
- Roth, SM, Martel, GF, et al. (2000). Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat Rec*, 260 (4), 351-358.
- Roubenoff, R, Baumgartner, RN, et al. (1997). Application of bioelectrical impedance analysis to elderly populations. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 52 (3), M129-136.
- Roubenoff, R and Hughes, VA (2000). Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55 (12), M716-724.
- Roux, PP and Blenis, J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68 (2), 320-344.
- Ryall, JG, Schertzer, JD, et al. (2007). Attenuation of age-related muscle wasting and weakness in rats after formoterol treatment: therapeutic implications for sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62 (8), 813-823.
- Ryan, MJ, Dudash, HJ, et al. (2010a). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Exp Gerontol*, 45 (11), 882-895.
- Ryan, MJ, Jackson, JR, et al. (2011a). Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. *Free Radic Biol Med*,
- Ryan, MJ, Jackson, JR, et al. (2011b). Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. *Free Radic Biol Med*, 51 (1), 38-52.
- Ryan, MJ, Jackson, JR, et al. (2010b). Suppression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65 (8), 815-831.
- Sabourin, LA and Rudnicki, MA (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 57 (1), 16-25.
- Safdar, A, Hamadeh, MJ, et al. (2010). Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS One*, 5 (5), e10778.
- Safdar, A, Little, JP, et al. (2011). Exercise Increases Mitochondrial PGC-1{alpha} Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis. *J Biol Chem*, 286 (12), 10605-10617.
-

- Saitoh, M, Nishitoh, H, et al. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J*, 17 (9), 2596-2606.
- Sajko, S, Kubinova, L, et al. (2004). Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J Histochem Cytochem*, 52 (2), 179-185.
- Sandri, M, Lin, J, et al. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (44), 16260-16265.
- Sandri, M, Sandri, C, et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117 (3), 399-412.
- Sastre, J, Asensi, M, et al. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, 263 (5 Pt 2), R992-995.
- Sastre, J, Pallardo, FV, et al. (1996). Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology*, 24 (5), 1199-1205.
- Sayer, AA, Syddall, H, et al. (2008). The developmental origins of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*, 12 (7), 427-432.
- Scarpulla, RC (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, 88 (2), 611-638.
- Schaap, LA, Pluijm, SM, et al. (2009). Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64 (11), 1183-1189.
- Schakman, O, Gilson, H, et al. (2008). Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol*, 197 (1), 1-10.
- Schmitz, ML, Bacher, S, et al. (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*, 26 (3), 186-190.
- Selsby, JT and Dodd, SL (2005). Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289 (1), R134-139.
- Selsby, JT, Rother, S, et al. (2007). Intermittent hyperthermia enhances skeletal muscle regrowth and attenuates oxidative damage following reloading. *J Appl Physiol*, 102 (4), 1702-1707.
- Semba, RD, Blaum, C, et al. (2003). Carotenoid and vitamin E status are associated with indicators of sarcopenia among older women living in the community. *Aging Clin Exp Res*, 15 (6), 482-487.
- Sen, CK, Khanna, S, et al. (1997). Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 237 (3), 645-649.
- Servais, S, Letexier, D, et al. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free Radic Biol Med*, 42 (5), 627-635.
- Seynnes, OR, Maffiuletti, NA, et al. (2008). Soleus T reflex modulation in response to spinal and tendinous adaptations to unilateral lower limb suspension in humans. *Acta Physiol (Oxf)*, 194 (3), 239-251.
- Shavlakadze, T and Grounds, M (2006). Of bears, frogs, meat, mice and men: complexity of factors affecting skeletal muscle mass and fat. *Bioessays*, 28 (10), 994-1009.
- Shefer, G, Van de Mark, DP, et al. (2006). Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle. *Dev Biol*, 294 (1), 50-66.
- Shiraishi, J, Tatsumi, T, et al. (2001). Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281 (4), H1637-1647.
- Short, KR, Vittone, JL, et al. (2005). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. *J Appl Physiol*, 99 (1), 95-102.
- Short, KR, Vittone, JL, et al. (2003). Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*, 52 (8), 1888-1896.

-
- Simone, C, Forcales, SV, et al. (2004). p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet*, 36 (7), 738-743.
- Singh, MA, Ding, W, et al. (1999). Insulin-like growth factor I in skeletal muscle after weight-lifting exercise in frail elders. *Am J Physiol*, 277 (1 Pt 1), E135-143.
- Siriatt, V, Platt, L, et al. (2006). Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. *J Cell Physiol*, 209 (3), 866-873.
- Siriatt, V, Salerno, MS, et al. (2007). Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther*, 15 (8), 1463-1470.
- Siu, PM (2009). Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. *Med Sci Sports Exerc*, 41 (10), 1876-1886.
- Siu, PM, Pistilli, EE, et al. (2005). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289 (4), R1015-1026.
- Siu, PM, Pistilli, EE, et al. (2008). Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol*, 105 (6), 1695-1705.
- Siu, PM, Pistilli, EE, et al. (2006). Hindlimb unloading increases muscle content of cytosolic but not nuclear Id2 and p53 proteins in young adult and aged rats. *J Appl Physiol*, 100 (3), 907-916.
- Sizemore, N, Lerner, N, et al. (2002). Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem*, 277 (6), 3863-3869.
- Smith, C, Wilson, NW, et al. (2007). Illuminating the interrelated immune and endocrine adaptations after multiple exposures to short immobilization stress by in vivo blocking of IL-6. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292 (4), R1439-1447.
- Smith, MA and Reid, MB (2006). Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol*, 151 (2-3), 229-241.
- Snijders, T, Verdijk, LB, et al. (2009). The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev*, 8 (4), 328-338.
- Sohal, RS, Agarwal, S, et al. (1994). Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev*, 76 (2-3), 215-224.
- Song, A, Wang, Q, et al. (1998). Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol Cell Biol*, 18 (9), 4994-4999.
- Spangler, EL, Waggle, KS, et al. (1994). Behavioral assessment of aging in male Fischer 344 and brown Norway rat strains and their F1 hybrid. *Neurobiol Aging*, 15 (3), 319-328.
- Spate, U and Schulze, PC (2004). Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7 (3), 265-269.
- Starnes, JW, Cantu, G, et al. (1989). Skeletal muscle lipid peroxidation in exercised and food-restricted rats during aging. *J Appl Physiol*, 67 (1), 69-75.
- Stevensner, T, Thorslund, T, et al. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontol*, 37 (10-11), 1189-1196.
- Strobel, NA, Peake, JM, et al. (2010). Antioxidant Supplementation Reduces Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis. *Med Sci Sports Exerc*,
- Suetta, C, Hvid, LG, et al. (2009). Effects of aging on human skeletal muscle after immobilization and retraining. *J Appl Physiol*, 107 (4), 1172-1180.
- Sumbayev, VV and Yasinska, IM (2005). Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys*, 436 (2), 406-412.
- Sundstrup, E, Jakobsen, MD, et al. (2010). Muscle function and postural balance in lifelong trained male footballers compared with sedentary elderly men and youngsters. *Scand J Med Sci Sports*, 20 Suppl 1 90-97.
- Tamilselvan, J, Jayaraman, G, et al. (2007). Age-dependent upregulation of p53 and cytochrome c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, 43 (12), 1656-1669.
-

- Tatsumi, R, Hattori, A, et al. (2002). Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell*, 13 (8), 2909-2918.
- Tatsumi, R, Liu, X, et al. (2006). Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290 (6), C1487-1494.
- Terjung, RL (1979). The turnover of cytochrome c in different skeletal-muscle fibre types of the rat. *Biochem J*, 178 (3), 569-574.
- Terman, A and Brunk, UT (2006). Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal*, 8 (1-2), 197-204.
- Thalacker-Mercer, AE, Dell'Italia, LJ, et al. (2010). Differential genomic responses in old vs. young humans despite similar levels of modest muscle damage after resistance loading. *Physiol Genomics*, 40 (3), 141-149.
- Theou, O, Gareth, JR, et al. (2008a). Effect of rest interval on strength recovery in young and old women. *J Strength Cond Res*, 22 (6), 1876-1881.
- Theou, O, Jones, GR, et al. (2008b). An exploration of the association between frailty and muscle fatigue. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33 (4), 651-665.
- Thomas, M, Langley, B, et al. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 275 (51), 40235-40243.
- Thomas, MM, Khan, W, et al. (2010). Initiating exercise training in late middle age minimally protects muscle contractile function and increases myocyte oxidative damage in senescent rats. *Exp Gerontol*, 45 (11), 856-867.
- Thompson, DD (2007). Aging and sarcopenia. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 7 (4), 344-345.
- Thompson, LV (2009). Age-related muscle dysfunction. *Exp Gerontol*, 44 (1-2), 106-111.
- Thompson, LV and Brown, M (1999). Age-related changes in contractile properties of single skeletal fibers from the soleus muscle. *J Appl Physiol*, 86 (3), 881-886.
- Thompson, LV, Lowe, DA, et al. (2001). Electron paramagnetic resonance: a high-resolution tool for muscle physiology. *Exerc Sport Sci Rev*, 29 (1), 3-6.
- Trappe, S, Trappe, T, et al. (2004). Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *J Physiol*, 557 (Pt 2), 501-513.
- Ugarte, N, Petropoulos, I, et al. (2010). Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 13 (4), 539-549.
- Ustanina, S, Carvajal, J, et al. (2007). The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*, 25 (8), 2006-2016.
- van der Loo, B, Bachschmid, M, et al. (2003). Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging: implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun*, 303 (2), 483-487.
- Van Gammeren, D, Damrauer, JS, et al. (2009). The IkappaB kinases IKKalpha and IKKbeta are necessary and sufficient for skeletal muscle atrophy. *FASEB J*, 23 (2), 362-370.
- Vandervoort, AA (2002). Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve*, 25 (1), 17-25.
- Vandervoort, AA, Kramer, JF, et al. (1990). Eccentric knee strength of elderly females. *J Gerontol*, 45 (4), B125-128.
- Vanitallie, TB (2003). Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. *Metabolism*, 52 (10 Suppl 2), 22-26.
- Vasilaki, A, Iwanejko, LM, et al. (2003). Skeletal muscles of aged male mice fail to adapt following contractile activity. *Biochem Soc Trans*, 31 (2), 455-456.
- Vasilaki, A, Mansouri, A, et al. (2006a). Free radical generation by skeletal muscle of adult and old mice: effect of contractile activity. *Aging Cell*, 5 (2), 109-117.
- Vasilaki, A, McArdle, F, et al. (2006b). Adaptive responses of mouse skeletal muscle to contractile activity: The effect of age. *Mech Ageing Dev*, 127 (11), 830-839.
- Vasilaki, A, van der Meulen, JH, et al. (2010). The age-related failure of adaptive responses to contractile activity in skeletal muscle is mimicked in young mice by deletion of Cu,Zn superoxide dismutase. *Aging Cell*, 9 (6), 979-990.

- Vazeille, E, Codran, A, et al. (2008). The ubiquitin-proteasome and the mitochondria-associated apoptotic pathways are sequentially downregulated during recovery after immobilization-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295 (5), E1181-1190.
- Veal, EA, Day, AM, et al. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*, 26 (1), 1-14.
- Verdijk, LB, Koopman, R, et al. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 (1), E151-157.
- Vina, J, Sastre, J, et al. (1992). Effect of aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. *Exs*, 62 136-144.
- Virbasius, JV and Scarpulla, RC (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (4), 1309-1313.
- Visser, M (2009). Towards a definition of sarcopenia--results from epidemiologic studies. *J Nutr Health Aging*, 13 (8), 713-716.
- Visser, M, Kritchevsky, SB, et al. (2002). Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc*, 50 (5), 897-904.
- Walker, AR, Walker, BF, et al. (2003). Nutrition, diet, physical activity, smoking, and longevity: from primitive hunter-gatherer to present passive consumer--how far can we go? *Nutrition*, 19 (2), 169-173.
- Walrand, S, Guillet, C, et al. (2011). Physiopathological mechanism of sarcopenia. *Clin Geriatr Med*, 27 (3), 365-385.
- Wanagat, J, Cao, Z, et al. (2001). Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J*, 15 (2), 322-332.
- Wang, XD, Kawano, F, et al. (2006). Mechanical load-dependent regulation of satellite cell and fiber size in rat soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290 (4), C981-989.
- Wang, ZM, Messi, ML, et al. (2000). L-Type Ca(2+) channel charge movement and intracellular Ca(2+) in skeletal muscle fibers from aging mice. *Biophys J*, 78 (4), 1947-1954.
- Warren, GL, Hayes, DA, et al. (1994). Eccentric contraction-induced injury in normal and hindlimb-suspended mouse soleus and EDL muscles. *J Appl Physiol*, 77 (3), 1421-1430.
- Wei, YH and Lee, HC (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*, 227 (9), 671-682.
- Welle, S, Bhatt, K, et al. (2002). Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp Gerontol*, 37 (6), 833-839.
- Wenke, JC, Warren, GL, et al. (2010). Mouse plantar flexor muscle size and strength after inactivity and training. *Aviat Space Environ Med*, 81 (7), 632-638.
- Wenz, T, Rossi, SG, et al. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (48), 20405-20410.
- Whidden, MA, McClung, JM, et al. (2009). Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol*, 106 (2), 385-394.
- Widegren, U, Jiang, XJ, et al. (1998). Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J*, 12 (13), 1379-1389.
- Widmann, C, Gibson, S, et al. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79 (1), 143-180.
- Widrick, JJ, Maddalozzo, GF, et al. (2008). Detrimental effects of reloading recovery on force, shortening velocity, and power of soleus muscles from hindlimb-unloaded rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295 (5), R1585-1592.
- Williamson, D, Gallagher, P, et al. (2003). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle. *J Physiol*, 547 (Pt 3), 977-987.

-
- Wolfe, RR (2006). Skeletal muscle protein metabolism and resistance exercise. *J Nutr*, 136 (2), 525S-528S.
- Wright, DC, Geiger, PC, et al. (2007a). Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 282 (26), 18793-18799.
- Wright, DC, Han, DH, et al. (2007b). Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem*, 282 (1), 194-199.
- Wu, H, Kanatous, SB, et al. (2002). Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, 296 (5566), 349-352.
- Wu, M, Desai, DH, et al. (2009). Acetaminophen prevents aging-associated hyperglycemia in aged rats: effect of aging-associated hyperactivation of p38-MAPK and ERK1/2. *Diabetes Metab Res Rev*, 25 (3), 279-286.
- Wu, Z, Puigserver, P, et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98 (1), 115-124.
- Wu, Z, Woodring, PJ, et al. (2000). p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol*, 20 (11), 3951-3964.
- Xu, X, Chen, CN, et al. (2010). Asymmetric superoxide release inside and outside the mitochondria in skeletal muscle under conditions of aging and disuse. *J Appl Physiol*, 109 (4), 1133-1139.
- Yaglom, JA, Ekhterae, D, et al. (2003). Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. Rapid deenergization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress kinase JNK, HSP72 and ARC. *J Biol Chem*, 278 (50), 50483-50496.
- Yakes, FM and Van Houten, B (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (2), 514-519.
- Yassierli and Nussbaum, MA (2007). Muscle fatigue during intermittent isokinetic shoulder abduction: age effects and utility of electromyographic measures. *Ergonomics*, 50 (7), 1110-1126.
- Yimlamai, T, Dodd, SL, et al. (2005). Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol*, 99 (1), 71-80.
- Young, A, Stokes, M, et al. (1984). Size and strength of the quadriceps muscles of old and young women. *Eur J Clin Invest*, 14 (4), 282-287.
- Young, A, Stokes, M, et al. (1985). The size and strength of the quadriceps muscles of old and young men. *Clin Physiol*, 5 (2), 145-154.
- Yu, BP (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74 (1), 139-162.
- Zahn, JM, Sonu, R, et al. (2006). Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS Genet*, 2 (7), e115.
- Zhang, BT, Yeung, SS, et al. (2010). The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC Cell Biol*, 11 87.
- Zhao, M, New, L, et al. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol Cell Biol*, 19 (1), 21-30.
- Zima, AV and Blatter, LA (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*, 71 (2), 310-321.
-

ANNEXES

Chapitre 1 : Fiches techniques

Fiche technique n°1 : Identification des populations d'études

POPULATION N°1

Modèle : Rat

Souche : Wistar

Sexe : Mâle

Age : 3 mois (jeunes) ou 24 mois (âgés)

Provenance :

- Elevage « Janvier » (Le Genest St Isle, France)
- Colonie de l'Animalerie Unité Centrale d'Investigation de la Faculté de Médecine de Valencia (Espagne)

Hébergement : animalerie

- UMR 6061 – Génétique et Développement (CNRS /Université Rennes 1)
- Unité Centrale d'Investigation (Facultad de Medicina / Universidad de Valencia)
- Rythme nuit-jour autoprogrammé de 12h
- Température entre 20 et 22°C

Alimentation :

- Croquettes produites et commercialisés par « HERSTELLER » et « PANLAB S.L » dont la valeur calorique est de 3100 kcal/kg
- Eau du robinet
- Alimentation et hydratation ad libitum

Répartition des animaux dans les différents groupes d'études :

- Répartition en 4 groupes aléatoires :
 - Contrôles sédentaires (C)
 - Entraînés (E)
 - Exposition au froid (F)
 - Injection d'hormones thyroïdiennes (T)



Fiche technique n°1 (2) : Identification des populations d'études

POPULATION N°2**Modèle :** Souris

Souche : C57BL/6

Sexe : Mâle

Modification génétique : Knock-out du gène PGC-1 α

Âge: 5 mois

**Provenance:**

- Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC, Madrid. Spain)

Hébergement : animalerie

- Unité Centrale d'Investigation (Facultad de Medicina / Universidad de Valencia)
- Rythme nuit-jour autoprogrammé de 12h
- Température entre 20 et 22°C

Alimentation :

- Croquettes produites et commercialisés par « PANLAB S.L » dont la valeur calorique est de 3100 kcal/kg
- Eau du robinet
- Alimentation et hydratation ad libitum

Répartition des animaux dans les différents groupes d'études :

- Répartition en 4 groupes aléatoires :
 - Wild-type sédentaires (WC)
 - Wild-type entraînés (E)
 - KO PGC-1 α sédentaires (KO-C)
 - KO PGC-1 α entraînés (KO-E)

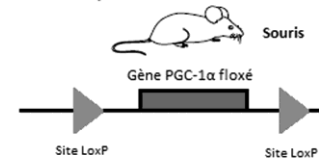
Fiche technique n°2 : Génération du modèle de souris KO PGC-1 α

Pour générer des souris déficientes du gène PGC-1 α par recombinaison homologue, le système Cre-Lox est utilisé. Ce système est basé sur l'action de la protéine recombinase Cre qui catalyse la recombinaison entre deux sites de reconnaissance, les sites LoxP.

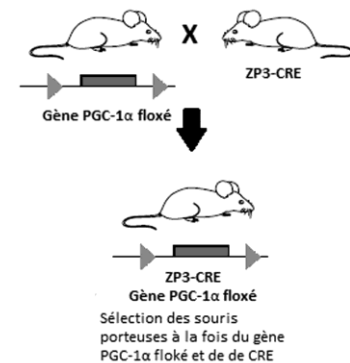
Un plasmide spécifique est construit avec la particularité de contenir le gène à invalider « floxé » (entouré) de deux sites loxP. Dans le cadre de notre modèle, un plasmide spécifique est construit dans lequel sont floxés les exons 3 à 5 du gène de PGC-1 α . Ces exons contiennent spécifiquement une région hautement conservée de PGC-1 α incluant le motif LXXLL régulant l'interaction de la protéine avec de nombreux récepteurs nucléaires. Une fois le plasmide mis au point, il est injecté dans des cellules souches embryonnaires puis les cellules ayant intégrées le plasmide par recombinaison homologue sont sélectionnées. Ces cellules sont alors injectées dans la cavité d'un blastocyte de souris ce qui permet d'obtenir des souris dites « chimères » dont certaines cellules sont modifiées et pas d'autres (**Etape 1**). Seule les souris porteuses de la mutation sur la lignée germinale sont alors utilisées pour l'étape suivante.

La désactivation du gène de PGC-1 α peut être obtenue en croisant deux souris différentes, l'une portant le gène de PGC-1 α floxé avec les sites loxP et l'autre portant le gène Cre (**Etape 2**). Dans notre modèle, une lignée de souris ZP3-Cre est utilisée permettant à la protéine Cre de s'exprimer spécifiquement lors du développement de l'ovocyte et de garantir ainsi l'élimination du gène cible de PGC-1 α sur l'ADN transmis par la femelle. Suite à cette manipulation, environ 50% de souris KO PGC-1 α ^{+/-} sont obtenues (**Etape 3**) et il suffit ensuite de croiser ces hétérozygotes entre eux pour obtenir environ 25% d'animaux possédant deux allèles débarrassées du gène PGC-1 α (KO PGC-1 α ^{-/-}). La survie des souris KO PGC-1 α ^{-/-} jusqu'à l'âge adulte correspond à environ la moitié du ratio de Mendel normalement attendu.

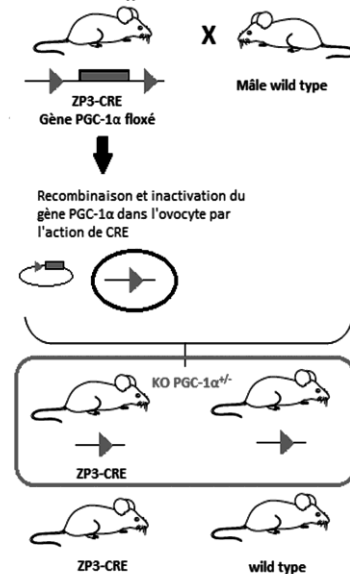
1. Création du plasmide et insertion dans cellules souches embryonnaires



2. Croisement avec une souris ZP3-CRE



3. Croisement d'une souris ZP3-CRE/gène PGC-1α floxé avec un mâle wild type

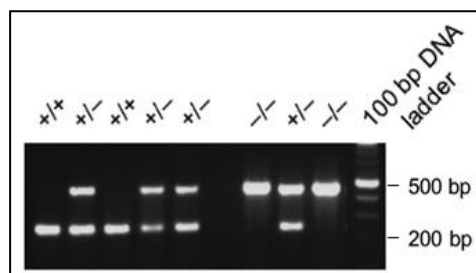


Références bibliographiques

- Lin et al. (2004)
- Lewandoski et al. (1997)

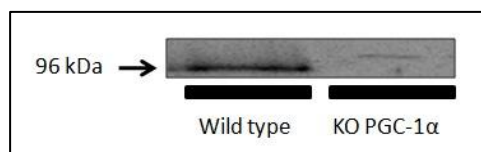
Fiche technique n°3 : Validation du modèle de souris KO PGC-1 α

Pour déterminer quels souriceaux sont homozygotes PGC-1 α ^{-/-} suite aux croisements entre souris hétérozygotes PGC-1 α ^{+/-}, le génotype de chaque souriceau est évalué en déterminant la présence de l'un ou l'autre de l'ADN spécifique Wild-type (WT) ou KO PGC-1 α . Cette évaluation s'effectue grâce à une extraction d'ADN d'un morceau de queue en utilisant le couple phénol-chloroforme. Les fragments d'ADN sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant les primers spécifiques pour les WT et les KO, puis séparés dans un gel d'agarose. Seuls les souriceaux PGC-1 α ^{-/-} sont sélectionnés pour nos expérimentations.



Génotypage de l'ADN prélevé à la queue de souriceaux. L'amplification des produits pour les allèles WT et KO correspondent respectivement à 240 paires de bases (bp) et 460 bp.

A l'arrivée des souris KO PGC-1 α ^{-/-} au sein de notre laboratoire, l'absence de la protéine PGC-1 α dans le tissu musculaire squelettique est vérifié par Western Blot sur quelques souris de la colonie avant de débiter les expérimentations.



Western Blot représentatif de la protéine PGC-1 α dans le tissu musculaire squelettique de souris WT ou KO PGC-1 α

Fiche technique n°4 (1) : Protocole d'entraînement en endurance

Organisation :

- Familiarisation des animaux durant une semaine à l'animalerie puis placement aléatoire dans les groupes sédentaires ou entraînés
- Familiarisation d'une semaine au tapis roulant
- *Test d'endurance pré-entraînement*
- Entraînement sur tapis roulant
- Réalisation de toutes les sessions d'entraînement au même moment de la journée, le matin
- *Test d'endurance post-entraînement*

Précisions concernant le protocole d'entraînement :

Le protocole d'entraînement est basé sur celui de Davies et al. (1982) auquel quelques modifications ont été apportées. L'intensité de l'entraînement (vitesse de course et pente du tapis) est adaptée à l'âge des animaux afin que tous courent à environ 75% de $\dot{V}O_{2MAX}$ après 2 semaines d'entraînement (Lawler et al. 1993). Le tapis est recouvert d'un drap opaque durant chaque entraînement afin de stimuler l'activité des rongeurs. Dans le même but, l'usage de légères décharges via une grille électrifiée à l'arrière du tapis est aussi utilisé. Les rats sédentaires sont également sollicités pour courir 10 min tous les 3 jours durant l'ensemble du protocole d'entraînement.

Précisions concernant le test d'endurance :

Les animaux doivent courir le plus longtemps possible à environ 80% de la consommation maximale en oxygène ($\dot{V}O_{2MAX}$). L'arrêt du test chez tous les animaux se caractérise par l'incapacité de l'animal à retourner sur le tapis malgré les décharges électriques qu'il reçoit sur la grille, puis à se retourner seul lorsqu'il est placé au sol sur le dos (Davies et al. 1982). Les tests pré et post-entraînement sont effectués 24h après la dernière séance d'acclimatation ou d'entraînement.

Populations concernées :

- Rats Wistar jeunes et âgés
- Souris C57BL/6 Wild type et KO PGC-1 α



Entraînement de rats sur tapis roulant

Références matériel

Tapis roulant : Exer 3/6 Treadmill
Colombus Instruments

Fiche technique n°4 (2) : Protocole d'entraînement en endurance

1. Protocole d'entraînement des rats Wistar jeunes durant 3 semaines

LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
Acclimatation : 15% de pente - 5' de course à 15m/min, 5' à 20m/min	Acclimatation : 15% de pente - 5' de course à 15m/min, 5' à 20m/min, 5' à 26m/min	Acclimatation : 15% de pente - 5' de course à 15m/min, 5' à 20m/min, 5' à 26m/min	Acclimatation : 15% de pente - 5' de course à 15m/min, 5' à 20m/min, 5' à 26m/min	Acclimatation : 15% de pente - 5' de course à 15m/min, 5' à 20m/min, 5' à 26m/min
Test d'endurance : 15% - 5' à 5m/min puis 26,8 m/min jusqu'à épuisement	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 20' à 24 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 25' à 26 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 30' à 28 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 35' à 30 m/min
Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 40' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 45' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 50' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 55' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min
Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min
Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 30 m/min	Test d'endurance : 15% - 5' à 5m/min puis 26,8 m/min jusqu'à épuisement		Sacrifices des animaux	

2. Protocole d'entraînement des rats Wistar âgés durant 3 semaines

LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
Acclimatation : 0% de pente - 5' de course à 9m/min, 5' à 12m/min	Acclimatation : 0% de pente - 5' de course à 9m/min, 5' à 12m/min	Acclimatation : 5% de pente - 5' de course à 9m/min, 5' à 12m/min	Acclimatation : 5% de pente - 5' de course à 9m/min, 5' à 12m/min	Acclimatation : 5% de pente - 5' de course à 9m/min, 5' à 12m/min
Test d'endurance : 5% - 5' à 5m/min puis 18 m/min jusqu'à épuisement	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 20' à 11 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 25' à 12 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 30' à 13 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 35' à 14 m/min
Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 40' à 15 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 45' à 15 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 50' à 15 m/min	Entraînement : 5% - 5' à 9m/min - 55' à 15 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min
Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min	Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min
Entraînement : 15% - 5' à 15m/min - 60' à 15 m/min	Test d'endurance : 5% - 5' à 5m/min puis 18 m/min jusqu'à épuisement		Sacrifices des animaux	

3. Protocole d'entraînement des souris C57BL/6 WT et KO PGC-1 α durant 4 semaines

LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
Acclimatation : 0% de pente - 5' de course à 5m/min puis 10' à 10m/min	Acclimatation : 5% - 5' à 5m/min - 10' à 12m/min	Acclimatation : 10% - 5' à 5m/min - 10' à 15m/min	Acclimatation : 10% - 5' à 5m/min - 10' à 15m/min	Acclimatation : 10% - 5' à 5m/min - 10' à 15m/min
Test d'endurance : 10% - 5' à 5m/min puis 20 m/min jusqu'à épuisement	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 20' à 15m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 25' à 16m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 30' à 17m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 35' à 18m/min
Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 40' à 19m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 45' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 50' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 55' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min
Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min
Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min
Entraînement : 10% - 5' à 5m/min - 60' à 20m/min	Test d'endurance : 10% - 5' à 5m/min puis 20 m/min jusqu'à épuisement		Sacrifices des animaux	

Fiche technique n°5 : Protocole d'exposition au froid

Organisation :

- Placement aléatoire des rats dans les groupes contrôles ou exposés au froid
- Les rats exposés au froid demeurent 24h dans leur cage dans une chambre froide ($4 \pm 1^\circ\text{C}$)
- Les rats contrôles restent dans leur cage dans un environnement à 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

Populations concernées :

- Rats Wistar jeunes et âgés

Précision concernant le protocole :

Le protocole d'exposition au froid est basé sur celui de Puigserver et al. (1998) auquel quelques modifications ont été apportées. Ce protocole est reconnu comme activant l'expression de PGC-1 α dans le tissu musculaire squelettique de jeunes rongeurs (Puigserver et al. 1998; Oliveira et al. 2004). Durant ce protocole, les rats conservent un accès libre en nourriture et en eau. L'état de santé des animaux (activité, alimentation, eau) est contrôlé toutes les 6h durant l'exposition au froid. Les animaux sont anesthésiés directement dans la chambre froide et immédiatement disséqués.

Fiche technique n°6 : Traitement par triiodothyronine

Organisation :

- Placement aléatoire des rats dans les groupes contrôles ou triiodothyronine (T3)
- Une dose unique en T3 est administrée (0,4 mg/kg) par injection intrapéritonéale
- Le véhicule seul (0,9% NaCl-propylène glycol) est administré aux rats contrôles

Populations concernées :

- Rats Wistar jeunes et âgés

Préparation du véhicule (0,9% NaCl-propylène glycol ; 40 :60 vol/vol) :

- Pour obtenir 20 ml de sérum physiologique à 0,9% : peser 180 mg de chlorure de sodium (NaCl) et ajouter de l'eau Ultrapure jusqu'à 20 ml.
- Pour préparer 20 ml du véhicule, mélanger 8 ml de sérum physiologique avec 12 ml de propylène glycol.

Préparation de la solution de T3:

Diluer 4 mg de 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3) dans les 20 ml du véhicule.

Références produits :

3,3',5-Triiodo-L-thyronine : Sigma T2877
NaCl : Sigma S7653
Propylène glycol : Sigma P4347

Précision concernant le protocole :

L'injection de T3 est reconnue comme activant l'expression de PGC-1 α dans le tissu musculaire squelettique de jeunes rongeurs (Irrcher et al. 2003; Bahi et al. 2005). Durant ce protocole, une solution véhicule de sérum physiologique et de propylène glycol (favorisant la dissolution des composés iodés) est utilisé pour diluer la T3 à une concentration de 0,2 mg/ml. Les animaux sont préalablement pesés afin d'individualiser le volume de la solution à injecter (environ 1 ml). Le même principe est appliqué aux rats contrôles mais seul le véhicule est administré. L'ensemble des animaux sont anesthésiés et disséqués 6h après l'injection.

Fiche technique n°7 : Protocole de suspension par la queue

Principe :

Le protocole utilisé pour mettre les animaux en condition d'inactivité radicale est celui de suspension par la queue (Morey-Holton and Globus 2002). Ce protocole permet de suspendre les effets de la pesanteur sur les membres inférieurs des rongeurs et a été initialement mis au point par la NASA pour mimer les effets des vols spatiaux. 8 cages ont été fabriquées artisanalement avec les dimensions et les détails techniques fournis dans la publication de Morey-Holton (Morey-Holton and Globus 2002).

Mise en place de la suspension des animaux :

Etape 1 : fixation de l'anneau à la queue de l'animal

- Préparation de bandes adhésives d'environ 1,5 cm de large pour 20 cm de longueur de manière à couvrir les 2/3 de la queue de l'animal.
- Placer l'animal dans un tube de plexiglas spécialement conçu pour l'immobiliser (il faut éviter d'anesthésier l'animal pour qu'il puisse s'adapter au mieux à la suspension)
- Passer de l'alcool sur la queue du rat pour la nettoyer et éliminer les peaux mortes
- Coller la bande d'adhésif préparée préalablement à environ 1 à 2 cm du début de la queue. Enrouler la queue avec l'adhésif jusqu'à la moitié de sa longueur (environ 3 tours). Ne pas serrer trop fort afin de limiter le moins possible la circulation sanguine.
- Passer l'anneau en acier dans l'adhésif puis enrouler de nouveau la queue avec le reste d'adhésif en repassant par-dessus l'adhésif préalablement collé. L'anneau est fixé alors à la queue de l'animal.

Etape 2 : Accrochage de l'animal dans la cage

- Placer l'émerillon dans l'anneau en acier. Cette pièce permet à l'animal de pivoter à 360° sur ses pattes avant afin de pouvoir boire et s'alimenter.
- Passer un câble électrique dans l'émerillon puis l'accrocher au système de suspension. Le dispositif de suspension se situe dans la partie supérieure de la cage entre 2 barres parallèles sur lesquels il peut glisser de part et d'autres de la cage. Ce système est fabriqué de manière à ce que le dispositif de suspension glisse avec le moins de résistance possible. L'animal peut ainsi tirer dessus sans effort et se déplacer aisément sur les pattes avant.
- La longueur du câble électrique est ajustée pour que le corps du rat soit suspendu à un angle de 30° avec le sol, de manière à ce qu'il ne puisse toucher le sol avec ses pattes arrière. Cette longueur est réajustée quotidiennement durant l'expérimentation si nécessaire.

Populations concernées :

- Rats Wistar jeunes

Matériel nécessaire pour la suspension de l'animal :

- Tube de Plexiglas pour immobiliser les rats
- Ruban adhésif type Elastoplast
- Anneau d'acier inoxydable (diamètre \approx 2 cm)
- Emerillons



- Fil de fer
- Alcool à 90°C
- Cage de suspension
- Un bac avec de la litière situé en dessous de la cage pour recueillir l'urine et les excréments



Photo d'une cage de suspension utilisée. Le rat se déplace sur une grille permettant de faire passer les excréments dans le bac situé en dessous. L'animal peut se rendre aisément au biberon pour s'hydrater et dispose de la nourriture posée à même le sol. Grâce à l'émerillon et le système de glissement, l'animal peut se rendre aux 4 coins de sa cage.

Fiche technique n°8 : Suivi des animaux au cours des études - Sacrifice

Contrôle du poids :

- Pesée sur une balance classique de tous les animaux au début et à la fin de tous les protocoles expérimentaux. Les animaux sont en plus pesés tous les 3 jours durant les protocoles d'entraînement.

But :

- Contrôler régulièrement l'état physique des animaux et leur tolérance aux différents protocoles expérimentaux
- Comparer l'évolution des masses corporelles des rats sédentaires et entraînés

Populations concernées :

- Rats Wistar jeunes et âgés
- Souris C57BL/6 Wild type et KO PGC-1 α

Références produits :

Pentobarbital de sodium : Ceva
Santé Animal

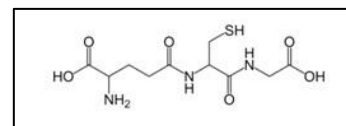
Sacrifice :

- Anesthésie réalisée 48h après la dernière session d'entraînement, immédiatement après l'exposition au froid ou 6h après l'injection d'hormones thyroïdiennes
- Anesthésie par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (50 mg/kg)
- Prélèvements pour l'ensemble des expérimentations des muscles soléaire et gastrocnemius. Ces échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C dans l'attente des analyses
- Dans certaines expérimentations, le sang est prélevé au niveau de la veine cave inférieure puis centrifugé à 1500G pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant constituant le plasma est alors prélevé et congelé à -80°C dans l'attente des analyses.

Fiche technique n°9: Dosage du glutathion total et oxydé

Principe du dosage du glutathion total :

Le glutathion total est quantifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon la méthode mise au point par Reed et al. (1980). La HPLC est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés contenus dans un mélange en vue de leur caractérisation et de leur quantification. Le système permettant d'effectuer cette séparation est appelé système de phases et est composé de la phase stationnaire et de la phase mobile. La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des groupements thiols (-SH), caractéristiques du glutathion, est la chromatographie d'adsorption. La procédure est basée sur la formation initiale dans un échantillon donné de dérivés S-carboxyméthyle à partir des groupes thiols sous l'action de l'acide iodoacétique. Ces composés sont alors convertis en dérivés de N-2,4-dinitrophenyl (N-DNP) par réaction avec le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB). La réalisation de l'ensemble de ces réactions constitue le processus de dérivation. L'échantillon contenant les dérivés de N-DNP est ensuite injecté dans le chromatographe. Les différents dérivés de N-DNP sont alors séparés dans une colonne constituée d'un gel de silice, puis détectés par absorption UV à une longueur d'onde de 365 nm. On obtient ainsi un chromatogramme permettant de caractériser et quantifier le glutathion.



Molécule de glutathion

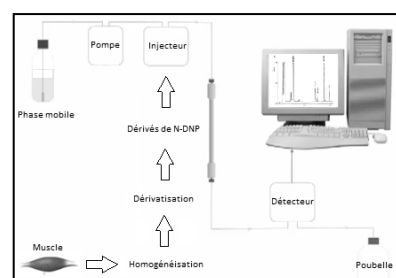
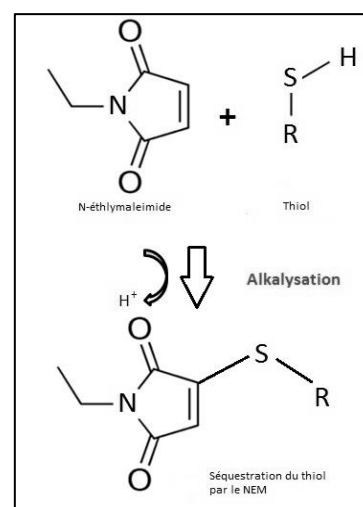


Schéma récapitulatif de la méthode pour quantifier le glutathion par HPLC

Principe du dosage du glutathion oxydé :

Le glutathion oxydé (GSSG) est également quantifié par HPLC selon la méthode d'Asensi et al. (1994). Cette méthode est une adaptation de celle de Reed et al. (1980) qui s'avère finalement être inappropriée pour quantifier le glutathion oxydé en raison de l'auto-oxydation du GSH se produisant durant le traitement des échantillons. L'ajout de N-éthylmaleimide (NEM) dans l'échantillon est donc effectué pour bloquer cette auto-oxydation. En effet, le NEM, en alkylant le groupement thiol du glutathion, permet une séquestration efficace du GSH et donc la prévention de son auto-oxydation.

Les procédés d'homogénéisation et de dérivation sont un peu différents de ceux utilisés pour le glutathion total mais le protocole de chromatographie reste quasiment le même.



Alkylisation d'un thiol

Fiche technique n°10 : Homogénéisation et dérivatisation des échantillons pour le glutathion total

Protocole d'homogénéisation :

- Homogénéiser 100 mg de tissu musculaire dans 1 ml d'acide perchlorique (PCA) 6 % contenant 1 mM d'acide disulfonique bathophénanthroline (BPDS). L'opération à l'aide d'un système composé d'un agitateur à hélice et d'un potter à Eppendorf. Remonter et descendre 15 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf
- Laisser reposer l'échantillon sur glace durant 30 min
- Centrifuger 15000G durant 15 min à 4°C
- Prélever le surnageant et stocker l'aliquot à -80°C dans l'attente de la dérivatisation

Protocole de dérivatisation :

- Pour 200 µl d'échantillon, ajouter 20 µl de standard interne (γ -glutamyl-glutamate 1mM dans PCA à 0,3%) et 20 µl d'acide iodoacétique. Le standard interne permettra par la suite de quantifier la concentration en glutathion total dans l'échantillon
- Neutraliser la préparation avec de l'hydroxyde de potassium (KOH 3M CHES 0,3M) afin d'obtenir une solution au pH situé entre 9 et 9,5 (sur papier pH on doit obtenir un rose très foncé). Si la solution devient trop basique, corriger avec solution de PCA 6% BPDS 1mM
- Incuber 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité 30 minutes
- Ajouter solution de FNDB 1%. Effectuer la dilution dans éthanol pour obtenir une solution à 1% Maintenir au minimum 4 heures dans obscurité à 4°C avant l'analyse HPLC. Les échantillons peuvent également être conservés pendant 2 à 3 mois à 4°C

Tampon d'homogénéisation :

- 43,5 ml de PCA à 69%
- 50,23 mg de BPDS
- QSP H₂O à 500 ml

Standard interne (γ -glutamyl-glutamate)

- 27,6 mg de γ -glutamyl-glutamate
- 43,5 µl de PCA à 69%
- QSP H₂O à 100 ml
- Préparer des aliquots de 1 ml (se conserve plusieurs mois à -20°C)

Acide iodoacétique :

- 90 mg d'acide iodoacétique
- 150 mg de pourpre de métacrésol (indicateur de pH)
- QSP H₂O à 500 ml

KOH 3M CHES 0,3M :

- 163,33 g d'hydroxyde de sodium
- 62,19 g de CHES
- QSP H₂O à 1L

Références produits :

Acide disulfonique bathophénanthroline : Sigma B1375
 Acide perchlorique 69% : Sigma 77230
 γ -glutamyl-glutamate : Sigma G3640
 Pourpre de métacrésol : Sigma 857890
 Acide iodoacétique : Sigma I4390
 Hydroxyde de sodium : Sigma P5958
 CHES : Sigma C2895
 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène : Sigma D1529

Références matériel :

Agitateur à hélices : VMA RW 16 basic
 Potter à piston conique

Fiche technique n°11 : Analyse HPLC du glutathion total

Protocole :

Injecter 80 µl de solution contenant l'échantillon. La phase mobile est constituée de 2 solvants :

- Eluant A : solution de méthanol à 80%
- Eluant B : solution de tampon acétoacétique (0,5M) dans du méthanol à 64%

L'ensemble du processus se déroule avec un flux constant de 1 mL/minute. L'élution des substances qui nous intéressent se réalise en appliquant le gradient suivant :

- La phase mobile se maintient durant 5 minutes à 20% de l'éluent B et à 80% de l'éluent A
- Après cette période, la quantité de l'éluent B commence à augmenter de manière linéaire jusqu'à 15 minutes de chromatographie où sont atteints un niveau de 99% de l'éluent B et un 1% du A
- Ces concentrations de solvants se maintiennent durant 5 à 10 minutes, dépendant du temps d'élution des derniers composants

Une fois l'élution des derniers composants d'intérêt effectuée, procéder à la rééquilibration de la colonne. Pour cela, revenir aux conditions initiales (20% de l'éluent B et 80% du A). Maintenir ainsi durant 15 minutes.

Analyse:

La figure ci-contre montre un chromatogramme d'un échantillon traité pour le calcul du glutathion total selon la méthode de Reed et al. (1980). On y observe :

- le pic de γ -glutamyl-glutamate servant de référence interne dont les concentrations en GSSG et GSH sont connues
- le pic de GSH
- un pic de GSSG, addition du GSSG présent initialement dans l'échantillon et du GSSG produit par l'auto-oxydation du GSH durant la préparation de l'échantillon

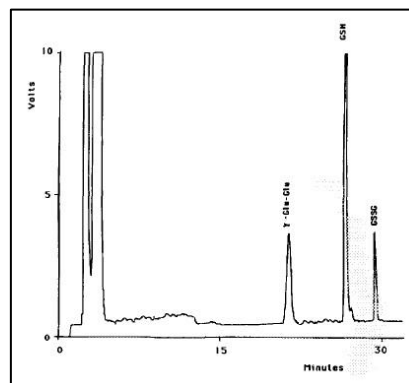
Le calcul de la concentration en glutathion oxydé se fait en quantifiant l'intégration des surfaces sous la courbe des pics de GSSG et de GSH par rapport à celle de γ -glutamyl-glutamate.

Eluant A

- 800 ml de méthanol
- QSP H₂O 1L

Eluant B :

- 41 g d'acétate de sodium
- 640 ml de méthanol
- QSP H₂O 1L



Chromatogramme d'un échantillon pour le calcul du glutathion total

Références produits :

Acétate de sodium : Sigma S2889

Références matériel :

Système HPLC :

- 2 pompes 511 (Waters)
- Injecteur 2157 (Pharmacia/LKB)
- Détecteur UV 441 (Waters)
- Ordinateur IBM XT 286
- Colonne chromatographe : Spherisorb (Waters) 20 x 0,46 cm et 5 µm de diamètre de particules

Fiche technique n°12 : Homogénéisation et dérivatisation des échantillons pour le glutathion oxydé

Protocole d'homogénéisation :

- Homogénéiser 100 mg de tissu musculaire dans 1 ml de PCA 6 % / 1 mM BPDS / 20 mM NEM. L'opération s'effectue à l'aide d'un système composé d'un agitateur à hélice et d'un potter à Eppendorf. Remonter et descendre 15 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf
- Laisser reposer l'échantillon sur glace durant 30 min
- Centrifuger 15000G durant 15 min à 4°C
- Prélever le surnageant et stocker l'aliquot à -80°C dans l'attente de la dérivatisation

Tampon d'homogénéisation :

- 43,5 ml de PCA à 69%
- 50,23 mg de BPDS
- 1,25 g de NEM
- QSP H₂O à 500 ml

Pourpre de métacrésol (0,2 M):

- 150 mg de pourpre de métacrésol (indicateur de pH)
- QSP H₂O à 500 ml

Protocole de dérivatisation :

- Pour 200 µl d'échantillon, ajouter 20 µl de standard interne (γ -glutamyl-glutamate 1mM dans PCA à 0,3%) et 20 µl de pourpre de métacrésol.
- Neutraliser la préparation avec de l'hydroxyde de potassium afin d'obtenir une solution au pH situé entre 9 et 9,5.
- Centrifuger 15000G / 15 minutes à 4°C
- Prélever 25 µl de surnageant et ajouter 50 µl de FNDB dilué à 1% dans l'éthanol.
- Maintenir 45 minutes dans obscurité à température ambiante
- Assécher les échantillons en utilisant un Speed-Vac de la manière suivante :
 - Ouvrir les Eppendorf
 - Centrifuger 20 minutes à 45°C
 - Vérifier que la phase liquide est évaporée, sinon centrifuger un peu plus de temps
- Les échantillons peuvent être ensuite conservés pendant plusieurs mois à -20°C dans l'attente de la chromatographie.

Références produits :

Acide disulfonique bathophénanthroline : Sigma B1375
 Acide perchlorique 69% : Sigma 77230
 γ -glutamyl-glutamate : Sigma G3640
 Pourpre de métacrésol : Sigma 857890
 Acide iodoacétique : Sigma I4390
 Hydroxyde de sodium : Sigma P5958
 CHES : Sigma C2895
 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène : Sigma D1529

Références matériel :

Agitateur à hélices : VMA RW 16 basic
 Express SpeedVac Concentrator System: Thermo Scientific SC250EXP

Fiche technique n°13 : Analyse HPLC du glutathion oxydé

Protocole:

Resuspendre les échantillons dans 200 µl de l'éluant A (Méthanol 80%/ eau Bi-D 20%). Injecter 80 µl de solution qui contient l'échantillon. La phase mobile est constituée de 2 solvants :

- Eluant A : solution de méthanol à 80%
- Eluant B : solution de tampon acétoacétique (0,5M) dans du méthanol à 64%

L'ensemble du processus se déroule avec un flux constant de 1mL/minute. L'élution des substances qui nous intéressent se réalise en appliquant le gradient suivant :

- La phase mobile se maintient durant 5 minutes à 20% de l'éluant B et à 80% de l'éluant A
- Après cette période, la quantité de l'éluant B commence à augmenter de manière linéaire jusqu'à 15 minutes de chromatographie où sont atteints un niveau de 99% de l'éluant B et un 1% de A
- Ces concentrations de solvants se maintiennent durant 5 à 10 minutes, dépendant du temps d'élution des derniers composants

Une fois l'élution des derniers composants d'intérêt effectuée, procéder à la rééquilibration de la colonne. Pour cela, revenir aux conditions initiales (20% de l'éluant B et 80% du A). Maintenir ainsi durant 15 minutes.

Analyse:

La figure ci-contre montre un chromatogramme d'un échantillon traité pour le calcul du glutathion total selon la méthode de Asensi et al. (1994). On y observe :

- le pic de γ -glutamyl-glutamate servant de référence interne dont la concentration en GSSG est connue
- le pic de GSSG

Le calcul de la concentration en glutathion oxydé se fait en quantifiant l'intégration de la surface sous la courbe du pic de GSSG par rapport à celle de γ -glutamyl-glutamate.

Calcul de la concentration en GSH :

A partir des concentrations en glutathion total en en GSSG obtenues, on peut calculer la concentration en GSH selon la formule suivante :

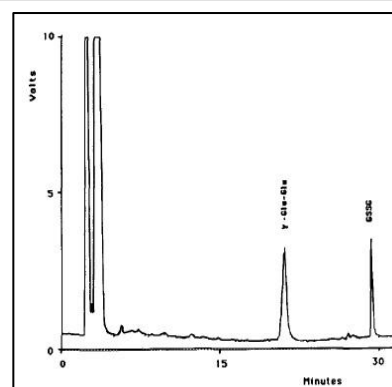
$$[\text{GSH}] = [\text{Glutathion total}] - 2[\text{GSSG}]$$

Eluant A

- 800 ml de méthanol
- QSP H₂O 1L

Eluant B :

- 41 g d'acétate de sodium
- 640 ml de méthanol
- QSP H₂O 1L



Chromatogramme d'un échantillon pour le calcul du glutathion oxydé

Références produits :

Acétate de sodium : Sigma S2889

Références matériel :

Système HPLC :

- 2 pompes 511 (Waters)
- Injecteur 2157 (Pharmacia/LKB)
- Détecteur UV 441 (Waters)
- Ordinateur IBM XT 286
- Colonne chromatographe : Spherisorb (Waters) 20 x 0,46 cm et 5 µm de diamètre de particules

Fiche technique n°14 : Activité de la xanthine oxydase et de la xanthine déshydrogénase

Principe:

Les activités de la xanthine oxydase (XO) et déshydrogénase (XDH) sont mesurées selon la technique développée par Beckman et al. (1989). Cette méthode est basée sur la mesure des variations de fluorimétrie due à la formation de l'isoxanthoptérine à partir de la ptérine. Pour déterminer les activités de la XO et de la XDH, l'oxygène et le bleu de méthylène sont respectivement utilisés comme accepteurs d'électrons.

Protocole d'homogénéisation :

- Un fragment de tissu musculaire est extrait et placé dans un Eppendorf contenant un tampon de phosphate spécifique (1 ml pour 100 mg de tissu). L'échantillon est placé dans la glace puis homogénéisé (15 passages dans le piston).
- La solution obtenue est centrifugée à 15000G pendant 30 minutes à 4°C, puis le surnageant est prélevé et congelé à -20°C.
- Quantification des protéines (cf. Fiche n°21)
- Les échantillons de plasma prélevés lors du sacrifice ne subissent aucun traitement avant analyse.

Préparation des réactifs utilisés :

- Tampon de phosphate 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4
- Ptérine (2-amino-4-hydroxyptérine) 1 mM. Peser 3 à 4 mg de ptérine et resuspendre dans 100 µl de NaOH 1M. Une fois le produit dissout, diluer dans l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 1 mM. Cette solution reste stable 1 à 2 jours à température ambiante
- Isoxanthoptérine 1 mM. Peser 3 à 4 mg d'isoxanthoptérine et resuspendre dans 100 µl de NaOH 1M. Une fois le produit dissout, diluer dans l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 1 mM. Diluer de nouveau cette solution dans le tampon de phosphate jusqu'à obtention d'une solution à 10 µM. La concentration exacte d'isoxanthoptérine se détermine de manière spectrophotométrique à une longueur d'onde de 365 nm. La concentration doit se situer entre 10 et 11 µM. Cette solution doit être préparée le jour même.
- Bleu de méthylène 1 mM dilué dans l'eau. Cette solution peut se conserver congelée.
- Allopurinol 1 mM dilué dans l'eau. Pour réussir une dilution parfaite, la solution doit être chauffée durant l'agitation. Cette solution peut se conserver congelée.

Tampon de phosphate (100 ml) :

- Solution A : 680,45 mg KH_2PO_4 + 3,7 mg EDTA / QSP H_2O 100 ml
- Solution B : 870,9 mg K_2HPO_4 + 3,7 mg EDTA / QSP H_2O 100 ml
- Prélever 70 mL de solution B et ajuster le pH à 7,4 avec la solution A

Le jour de l'homogénéisation, ajouter (pour 40 ml de tampon) :

- 6,84 g de sucrose (0,5M)
- 308,5 mg de dithiothréitol (DTT) (50 mM)
- 7 mg PMSF (1 mM)

Références produits :

EDTA: Sigma E5513
 Sucrose : Sigma S0389
 DTT: Sigma D0632
 PMSF : Sigma P7626
 KH_2PO_4 : Sigma P8416
 K_2HPO_4 : Sigma P3786
 Ptérine : Sigma P1132)
 Isoxanthoptérine : Sigma I7388
 Bleu de méthylène : Sigma MB1
 Allopurinol: Sigma Aldrich A8003

Fiche technique n°15 : Activité de la xanthine oxydase et de la xanthine déshydrogénase (Quantification)

Protocole :

La variation de fluorescence générée par la formation de l'isoxanthoptérine se mesure à 345 nm d'excitation et 390 nm d'émission. L'ensemble du processus se réalise avec un détecteur de fluorescence thermorégulé à 37°C.

Pour chaque échantillon :

- Injecter dans une cuve de quartz 25 µl de l'échantillon et ajouter le tampon de phosphate jusqu'à atteindre un volume final de 2 ml
- Mesurer l'émission de fluorescence à 345 nm d'excitation et 390 nm d'émission durant 1 minute. Cette valeur constitue le blanc.
- Ajouter 20 µl de la solution de ptérine et mesurer l'émission de fluorescence durant 2 minutes. La pente obtenue est l'indicateur servant à calculer ensuite l'activité de la xanthine oxydase
- Ajouter 20 µl de la solution de bleu de méthylène 1 mM et mesurer l'émission de fluorescence durant 2 minutes. La pente obtenue est l'indicateur servant à calculer ensuite les activités de la xanthine oxydase et déshydrogénase ensemble.
- Ajouter 20 µl de la solution d'allopurinol 1 mM et mesurer l'émission de fluorescence durant 1 minutes. La fluorescence ne doit pas varier puisque l'allopurinol inhibe aussi bien l'activité de la XO que celle de la XDH
- Effectuer une mesure ponctuelle de fluorescence qui sera utilisée comme blanc pour calibrer l'isoxanthoptérine.
- Ajouter 20 µl de la solution d'isoxanthoptérine 10 µM. Effectuer une nouvelle mesure ponctuelle. Ainsi, on obtient l'augmentation de la fluorescence due à l'ajout d'isoxanthoptérine. L'isoxanthoptérine constitue ainsi une valeur étalon interne.

Pour calculer les activités de la XO et XDH, l'unité d'activité se définit comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 µM d'isoxanthoptérine en 1 minute. Dans le plasma, elle est exprimée en unité par litre de plasma, dans le muscle en unité par mg de protéines.

Pour l'activité de la xanthine oxydase :

$$U = (\Delta F. \min) \times \frac{[\text{Isoxanthoptérine}] \times 0,02}{2,08 \times 1000 \times F_{\text{Isoxanthoptérine}}} \times V_{\text{final}} / V_{\text{Echantillon}}$$

- **ΔF.min** : la variation de fluorescence observée en une minute après l'ajout de ptérine
- **[Isoxanthoptérine]** : la concentration en isoxanthoptérine
- **F_{Isoxanthoptérine}** : l'augmentation immédiate de fluorescence qui se produit après l'ajout de l'isoxanthoptérine
- **V_{Final}** : volume de la cuve une fois la ptérine ajouté (2,02 ml)
- **V_{Echantillon}** : volume d'échantillon injecté (0,025 ml)

Pour l'activité de la xanthine oxydoréductase (XOR) :

$$U = (\Delta F. \min) \times \frac{[\text{Isoxanthoptérine}] \times 0,02}{2,08 \times 1000 \times F_{\text{Isoxanthoptérine}}} \times V_{\text{final}} / V_{\text{Echantillon}}$$

- **ΔF.min** : la variation de fluorescence observée en une minute après l'ajout du bleu de méthylène
- **V_{Final}** : volume de la cuve une fois le bleu de méthylène ajouté (2,04 ml)
- **V_{Echantillon}** : volume d'échantillon injecté (0,025 ml)

Pour l'activité de la xanthine déshydrogénase (XDH):

$$\text{Activité XDH (U/L)} = \text{Activité de la XOR} - \text{Activité de la XO}$$

Références matériels:

Fluorimètre : Lecteur Microplaque 3 en 1 (Biotek Synergy HT)

Fiche technique n°16 : Extraction de l'ARN à partir du tissu musculaire

Principe :

L'extraction de l'ARN à partir du tissu musculaire est effectuée avec le kit RNeasy Fibrous Tissue de QIAGEN. L'ensemble de l'extraction s'effectue dans une zone stérile prévue uniquement à cet effet ainsi qu'avec du matériel stérile destiné uniquement à l'extraction d'ARN.

Homogénéisation:

- Peser 10-15 mg de tissu musculaire et le passer en poudre dans le nitrogène liquide
- Ajouter 300 µl de tampon RLT avec le β-mercaptoethanol (pour inhiber les ARNases)
- Homogénéiser à l'aide d'un système composé d'un agitateur à hélice et d'un potter à Eppendorf. Remonter et descendre 10 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf
- Laisser l'échantillon 1 min à température ambiante

Extraction de l'ARN

- Ajouter à chaque échantillon 520 µl d'eau bidistillée du kit puis 80 µl de Protéinase K. Resuspendre plusieurs fois
- Incuber 1h à 55°C avec agitation pour potentialiser l'effet de la protéinase K. Laisser ensuite 1 min à température ambiante
- Centrifuger 3 min à 13000 RPM à 22°C
- Prélever le surnageant (en évitant le contact avec le culot) et transférer à un nouvel Eppendorf. Jeter le tube avec le culot

- Diluer le surnageant avec 600 µl d'éthanol pur et le remuer lentement pour le mélanger
- Prélever 700 µl de surnageant et le passer dans un nouvel Eppendorf avec une colonne rose (sans toucher la colonne). Centrifuger 15 s / 13000 RPM à 22°C. Jeter la solution au fond du tube (L'ARN reste contenu dans la colonne). Répéter l'opération avec les 700 µl de surnageant restant.
- Ajouter 350 µl du tampon RW1 dans la colonne. Préparer l'ADNase : 70 µl du tampon RDD + 10 µl d'ADNase pour chaque échantillon. Centrifuger l'Eppendorf avec la colonne durant 15 s / 13000 RPM / 22°C
- Ajouter immédiatement la solution d'ADNase dans chaque échantillon. L'ajouter bien au centre de la colonne sans toucher les parois de la colonne. Laisser l'ADNase agir durant 15 min à température ambiante
- Ajouter 350 µl de tampon RW1 dans la colonne. Centrifuger 15 s / 13000 RPM / 22°C.
- Ajouter 500 µl de tampon RPE pour effectuer un nouveau lavage en centrifugeant 15 s / 13000 RPM / 22°C. Répéter l'opération une seconde fois
- Passer la colonne dans un nouvel Eppendorf et centrifuger à sec 2 min / 13000 RPM / 22°C.
- Elution : passer la colonne dans un nouvel Eppendorf y ajouter 30 µl d'eau bistillée libre d'ARN du kit et laisser agir 10 min. Centrifuger 1 min à 13000 RPM / 22°C. Aliquoter ensuite les 30 µl du tube dans plusieurs tubes stériles de 5 µl.

Lors de l'ouverture du kit :

- Reconstituer le tampon RPE avec de l'éthanol pur (1 vol/4 vol)
- Resuspendre l'ADNase avec 550 µl d'eau bistillée du kit en utilisant une seringue pour percer le bouchon. Dissoudre en effectuant de lentes rotations
- Aliquoter l'ADNase reconstituée en tube en 10 µl puis stocker à -20°C

Avant chaque utilisation du kit :

- Préparer le tampon RLT : 10 µl de β-mercaptoethanol pour 990 µl de RLT
- Régler l'incubateur à 55°C et la centrifugeuse à 22°C

Références produits :

RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit :
QIAGEN 74704

Références matériels :

Agitateur Incubateur : Sartorius
Biotech CERTOMAT IS

Fiche technique n°17 : Quantification de l'ARN

Quantification de l'ARN :

La quantification de l'ARN dans chaque échantillon est effectuée grâce à l'appareil spectrophotométrique, le GeneQuant et des capillaires de quartz pour introduire les extraits d'ARN dans l'appareil.

Le blanc est préalablement déterminé avec de l'eau DEPC. On introduit ensuite l'extrait d'ARN (1 µl). L'appareil mesure l'absorption à 230, 260, 280, 320, 595, et 600 nm. La concentration en ARN et la pureté de l'échantillon sont calculées automatiquement à partir des valeurs d'absorbance obtenues à 260 et 280 nm. Un extrait d'ARN avec un ratio A_{260}/A_{280} situé entre 1,8 et 2,0 est considéré comme de bonne qualité.



Le GeneQuant

Références matériels:

GeneQuant pro RNA/DNA
Calculator : GE Healthcare
Capillaires de quartz : GE Healthcare

Fiche technique n°18 : Reverse transcriptase

Principe :

La reverse transcriptase est effectuée avec le kit HighCapacity cDNA Archive et le thermocycleur Gene Amp PCR System 9700.

Protocole :

- 1 à 2 µg d'ARN sont recommandés pour effectuer la reverse transcriptase (RT). Calculer le volume d'échantillon nécessaire pour obtenir 2 µg d'ARN et compléter à 25 µl avec de l'eau stérile libre d'ARN.
- Préparer un volume adéquat de tampon *Reverse Transcriptase 2X*
- Conserver ce tampon dans la glace jusqu'à la préparation des plaques
- Pipeter dans une plaque de 96 puits 25 µl du tampon et ajouter ensuite les 25 µl d'échantillon puis recouvrir chaque puit d'un capuchon prévu à cet effet. Centrifuger brièvement. Placer la plaque dans la glace.
- Programmer le thermocycleur avec les conditions suivantes :
 - Etape 1 : 25°C durant 10 min
 - Etape 2 : 37°C durant 120 min
- Régler la réaction pour un volume de 50 µl
- Charger la plaque et lancer la transcription inverse
- Une fois la RT terminée, ajouter 150 µl d'eau stérile libre d'ARN dans chaque échantillon. Stocker à -20°C dans l'attente de la qPCR



Gene Amp PCR System 9700

Tampon Reverse Transcriptase 2X (pour un échantillon) :

- 5µl de la solution *Random primers 25X*
- 5µl du tampon *Reverse Transcription 10X*
- 2 µl de la solution *dNTP 25X*
- 2,5 µl de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (enzyme)
- 10,5 µl d'eau stérile libre d'ARN

Références produits:

HighCapacity cDNA Archive :
Applied Biosystems

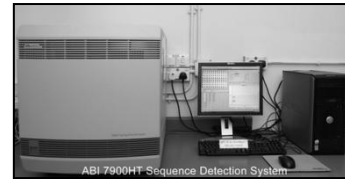
Références matériels:

Gene Amp PCR System 9700 :
Applied Biosystems
MicroAmp Optical 96-Well Reaction
Plate : Applied Biosystems

Fiche technique n°19 : PCR en temps réel

Principe :

La PCR en temps réel est effectuée en utilisant le Mix SYBR Green PCR Master et le système de détection ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR.



ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System

Tampon Mix SYBR Green (pour un échantillon)

- 10 µl de Mix SYBR Green 4°C
- 2 µl du primer sens 3 µM
- 2 µl du primer Anti-sens 3 µM
- 1 µl d'eau stérile

Références produits:

HighCapacity cDNA Archive :
Applied Biosystems

Références matériels:

ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System: Applied Biosystems

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate : Applied Biosystems

Protocole :

- Pour chaque échantillon, prélever 1 µl de la solution obtenu suite à la RT puis compléter d'eau stérile jusqu'à 20 µl. On obtient ainsi une solution de concentration 0,5 ng/µl.
- Préparer le volume adéquat du tampon Mix SYBR Green en fonction du nombre d'échantillon
- Pipeter 5 µl l'échantillon dilué puis l'injecter dans le puit de la plaque. Répéter l'opération pour chaque échantillon pour le gène de référence (18S ou cyclophiline). Ajouter un puit avec 5 µl d'eau (blanc). Préparer 3 puits pour chaque échantillon.
- Ajouter dans chaque puit le mélange SYBR Green préalablement préparé avec les primer sens et anti-sens du gène concerné.
- Remuer délicatement la plaque pour faire tomber toutes les gouttes au fond des puits. Recouvrir la plaque d'un film plastique.
- Placer la plaque de l'appareil et lancer l'amplification. Les conditions utilisées sont les suivantes : 10 min à 96°C pour activer l'enzyme suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C/1 min à 60°C.
- Vérifier que les blancs n'ont pas amplifié à la fin de la PCR.

Analyse des résultats :

A la fin de du processus, le logiciel nous fournit le cycle seuil (ΔCt) de détection pour chaque puit. Effectuer la moyenne des triplicatas pour chaque échantillon. La méthode de quantification relative $2^{\Delta(-\Delta Ct)}$ est utilisée pour quantifier un gène cible dans les différents groupes expérimentaux comparés au groupes contrôle (Jeunes contrôles). Le gène 18S était utilisé comme contrôle interne. La formule suivante était utilisée :

Quantité de la cible gène/contrôle interne = $2^{\Delta(-\Delta Ct_B - \Delta Ct_A)}$

$$\Delta Ct_B = \Delta Ct_{\text{Gène cible}} - \Delta Ct_{18S}$$

$$\Delta Ct_A = \text{Moyenne groupe contrôle } (\Delta Ct_{\text{Gène cible}}) - \text{Moyenne groupe contrôle } (\Delta Ct_{18S})$$

Exemple de calcul :

$$\Delta Ct_{Myf5} = 33,99 \text{ cycles}$$

$$\Delta Ct_{18S} = 20,01 \text{ cycles}$$

$$\text{Moyenne groupe contrôle } (\Delta Ct_{Myf5}) = 31,92 \text{ cycles}$$

$$\text{Moyenne groupe contrôle } (\Delta Ct_{Myf5}) = 16,18 \text{ cycles}$$

$$\text{Soit } \Delta Ct_B = 33,99 - 20,01 = 13,98 \text{ cycles}$$

$$\Delta Ct_B = 31,92 - 16,18 = 15,74 \text{ cycles}$$

$$\text{Quantité Myf5/18S} = 2^{\Delta(-13,98 - 15,74)} = 3,36$$

Fiche technique n°20 : Etude de l'expression des protéines par la technique de Western Blot

Principe général :

Le western blot ou immunoblot est une méthode de protéomique, ayant recours à la biologie moléculaire, la biochimie et l'immunogénétique, pour détecter une protéine spécifique sur un échantillon donné d'extrait ou d'homogénat tissulaire. Brièvement, la technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (nitrocellulose ou PVDF) puis exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est ainsi possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa masse et de comparer son expression en fonction de différentes conditions expérimentales.

Interêts de la technique :

Sensibilité :

- Faible quantité d'antigène détectable
- Faible quantité d'anticorps requise

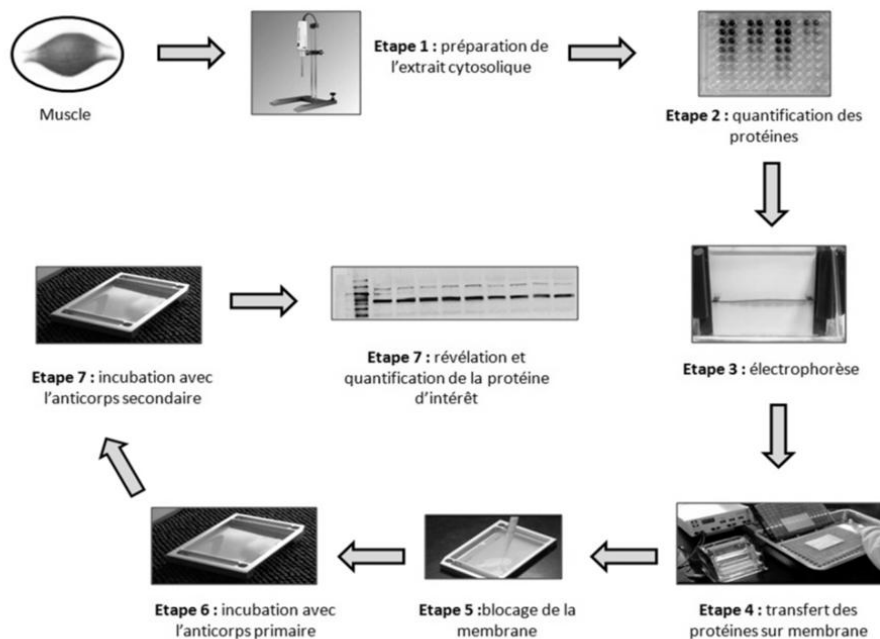
Hautement résolatif :

- Signal facilement quantifiable
- Fort contraste
- Sécurité de la chimioluminescence (non radioactif)

Limites de la technique

- Technique semi-quantitative
- Normalisation des résultats dans l'étude de population importante
- Sensibilité variable (spécificité et qualité de l'anticorps)

Schéma récapitulatif de la technique « Western Blot »



Fiche technique n°21 : Protocoles d'extractions totaux, cytosoliques et nucléaires pour Western Blot

Protocole d'homogénéisation pour extraits totaux :

- Homogénéiser 100 mg de tissu musculaire dans 1 ml de tampon de lyse A. L'opération s'effectue à l'aide d'un système composé d'un agitateur à hélice et d'un potter à Eppendorf. Remonter et descendre 15 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf.
- Passer les échantillons 3 fois 10 s dans le sonicateur dans le but de favoriser la rupture des membranes nucléaires et mitochondriales. Toute l'opération s'effectue à 4°C.
- Laisser reposer l'échantillon sur glace durant 30 min
- Centrifuger 12000G durant 12 min à 4°C
- Prélever le surnageant et congeler à -80°C dans l'attente des analyses futures.

Protocole d'homogénéisation pour extraits nucléaires :

- Homogénéiser 100 mg de tissu musculaire dans 1 ml de tampon de lyse A. L'opération s'effectue à l'aide d'un système composé d'un agitateur à hélice et d'un potter à Eppendorf. Remonter et descendre 15 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf.
- Centrifuger 1500G durant 10 min à 4°C
- Prélever le surnageant et congeler à -80°C dans l'attente des analyses futures. Cet extrait constitue **la fraction cytosolique** débarrassée du noyau.
- Resuspendre le culot dans 400 µl de tampon de lyse B. Vortexer pendant 15 s
- Passer les échantillons 3 fois 10 s dans le sonicateur. Toute l'opération s'effectue à 4°C.
- Laisser reposer l'échantillon sur glace durant 30 min
- Centrifuger 14000G RPM durant 15 min à 4°C
- Prélever le surnageant et congeler à -80°C dans l'attente des analyses futures. Cet extrait constitue **la fraction nucléaire**.

Tampon de lyse A (pour 50 ml) :

- 60,57 mg de Tris Base (10 mM)
- 8,46 g de sucrose (0,5 M)
- 146 mg NaCl (50 mM)
- 93 mg EDTA (5 mM)
- 333 mg de pyrophosphate de sodium (30 mM)

Tampon de lyse B (pour 50 ml) :

- 60,57 mg de Tris Base (10 mM)
- 4,27 g de sucrose (0,5 M)
- 1,17 g NaCl (400 mM)
- 93 mg EDTA (5 mM)
- 333 mg de pyrophosphate de sodium (30 mM)

Le jour de l'homogénéisation, ajouter aux tampons A et B:

- 500 µl de NP40 (1%)
- 125 mg de sodium deoxycholate (0,25%)
- 250 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases (5 µl/ml de tampon)
- 105 de NaF (50 mM)
- 25 µl d'orthovanadate de sodium (100 µM)

Références produits :

Tris Base : Sigma T1503
 Sucrose : Sigma SO389
 NaCl : Sigma S7653
 EDTA : Sigma E9884
 Pyrophosphate de sodium : Sigma P8010
 NP40 : Sigma I3021
 Sodium deoxycholate : Sigma D6750
 Inhibiteur de protéases : Sigma P8340
 NaF : Sigma S7920
 Orthovanadate de sodium : Sigma S6508

Références matériel :

Agitateur à hélices : VMA RW 16 basic
 Potter à piston conique

Fiche technique n°22 : Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Principe :

Cette méthode a été développée par **Lowry et al. (1951)** afin de déterminer la quantité totale de protéines contenue dans un échantillon.

Protocole :

- Préparer le milieu réactionnel : (pour obtenir 40 mL de ce milieu)
 - Solution B : 400 µL
 - Solution C : 400 µL
 - QSP Solution A 40 mL : 39,2 mL
- Faire en double 1 gamme de 0 à 25 mg/mL de Sérum Albumine Bovine (BSA) à partir d'une solution à 50 mg/mL
- Diluer les échantillons et la gamme au 1/50 : 10 µL d'homogénat/gamme dans 490 µL d'eau bidistillée. Prévoir 3 dosages par échantillons
- Ajouter 500 µL de milieu réactionnel dans chaque tube (gamme et échantillons)
- Incuber 30 min dans l'obscurité à température ambiante
- Ajouter 250 µL de réactif de Folin
- Incuber 20 min dans l'obscurité à température ambiante
- Doser par spectrophotométrie à 660 nm (lecteur microplaque)

Intérêts de la méthode

- Grande sensibilité (de l'ordre de 5-10 µg)

Préparation des solutions stock pour Lowry (conserver à 4°C dans l'obscurité)

Solution A :

- NaOH : 0,4 g
- CO₃Na₂ : 2 g
- QSP H₂O : 100 ml

Solution B (Sulfate de cuivre 1%)

- CuSO₄5H₂O : 0,4 g
- QSP H₂O : 10 ml

Solution C (Tartrate de sodium 1%)

- C₄H₄O₆Na₂ : 0,4 g
- QSP H₂O : 10 ml

Références produits :

BSA : Sigma A7906

Réactif de Folin : Sigma F9252

NaOH : Sigma 71694

CO₃Na₂ : Sigma S7795

CuSO₄5H₂O : Fluka 61230

C₄H₄KNaO₆·4H₂O : Sigma S2377

Référence matériel :

Spectrophotomètre : Lecteur

Microplaque 3 en 1 (Biotek Synergy HT)

Fiche technique n°23 : Electrophorèse – Préparation des gels

Principe de l'électrophorèse : cette opération vise à séparer les protéines d'un échantillon selon leurs poids moléculaire. Ces protéines, chargées négativement sous l'effet du Sodium DocéylSulfate (SDS), sont placées sous l'influence d'un champ électrique dans un gel d'acrylamide, ce qui permet leur séparation selon leur poids moléculaire. On parle de **SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**.

Préparation du gel de séparation pour 2 gels de 1,5 mm (exemple à 12,5% Acrylamide) :

- Préparer dans un Falcon de 50 mL :
 - 8019 µl d'H₂O bidistillée
 - 4000 µl TRIS 1,5 M pH 8,8
 - 3645 µl d'Acrylamide 40%
 - 160 µl SDS 10 %
 - 160 µl APS 10 %
 - 16 µl TEMED
- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'à 0,5 cm du peigne
- Ajouter de l'eau bidistillée avec une pipette pasteur pour faire disparaître les bulles et de manière à obtenir une surface plane
- Après polymérisation, enlever l'eau bidistillée

Préparation du gel de concentration pour 2 gels de 1,5 mm (exemple à 4 % Acrylamide) :

- Préparer dans un Falcon de 15 mL :
 - 5000 µl d'H₂O bidistillée
 - 2000 µl TRIS 0,5 M pH 6,6
 - 800 µl d'Acrylamide 40%
 - 80 µl SDS 10 %
 - 80 µl APS 10 %
 - 10 µl TEMED
- Couler le gel entre les plaques de verre en remontant jusqu'à en haut des plaques puis ajouter le peigne
- Après polymérisation, retirer les peignes et rincer les puits avec une pissette d'eau bidistillée.
- Monter l'appareil de migration
- Remplir les réservoirs supérieur et inférieur de la cuve avec le tampon de migration 1X

Préparation des solutions stock :

- **Persulfate d'ammonium (APS) 10% :** dissoudre 100 mg d'APS dans 1 ml d'eau bidistillée
- **Tris 1,5 M, pH 8,8 :**
 - Tris Base : 27,23 g
 - H₂O bidistillée : 80 ml
 - Ajuster le pH à 8,8 avec HCl
 - QSP H₂O à 150 ml
- **Tris 0,5 M, pH 6,8 :**
 - Tris Base : 6 g
 - H₂O bidistillée : 60 ml
 - Ajuster le pH à 6,8 avec HCl
 - QSP H₂O à 100 ml
- **SDS 10 % :** dissoudre 10 g de SDS dans 100 ml d'eau bidistillée
- **Tampon de migration 5X :**
 - Tris Base : 15 g
 - Glycine : 72 g
 - SDS : 5 g
 - QSP H₂O à 1 L

Rôle des gels :

- **Le gel de concentration** ("stacking gel") est le gel dans lequel les protéines entrent dans l'acrylamide. Il sert à entasser les diverses espèces protéiques en bandes très minces pour augmenter la résolution de la séparation. Dans cette section du gel les protéines ne se séparent pas, elles migrent ensemble en s'entassant dans un volume plus petit que le dépôt. L'acrylamide y est très peu concentré (autour de 4%) de sorte que toutes les protéines migrent ensemble à la même vitesse

- **Le gel de séparation** ("separating gel") est le gel dans lequel les protéines entassées dans le gel de tassement se séparent les unes des autres. L'acrylamide y est plus concentré (de 8 à 20%) de sorte que les protéines se séparent puisqu'elles migrent à des vitesses différentes, étant retardées selon leur poids moléculaire.

Références produits

Ammonium Persulfate : Sigma A3678
 SDS : Sigma L390
 Temed : Sigma T9281
 Glycine : Sigma G7126
 Acrylamide bis 40% : Bio-Rad 161-0148

Fiche technique n°24 : Electrophorèse – Préparation des échantillons et migration



Ensemble du matériel nécessaire pour la préparation des gels et l'électrophorèse

Utilité du Bleu de bromophénol :

Le tampon de l'échantillon versé dans chaque puit contient un colorant ionisé, généralement le bleu de bromophénol, qui permet de suivre l'électrophorèse. Ce colorant n'est absolument pas retardé durant la migration et indique donc le front de migration électrophorétique. Quant il atteint le bas du gel, l'électrophorèse est arrêtée.

Préparation du tampon de dépôt 3X (50 mL):

- Tris-HCl à 0,5 M, pH 6,8 : 3,15 mL
- Glycerol : 10 mL
- SDS 20% : 5 mL
- β -mercaptoéthanol : 2,4 mL
- H₂O : 29,45 mL
- Bleu de bromophénol à 1% : 50mg

- Aliquoter et stocker à -20°C

Préparation des solutions stock :

Bleu de bromophénol

- Bleu de bromophénol : 100 mg
- H₂O distillée : 10 mL
- Aliquoter puis conserver à -20°C

Préparation des dépôts :

- Diluer au 1/3 les échantillons avec ce tampon en ajustant les volumes d'échantillons de manière à avoir la même quantité de protéines dans chaque puit
- Chauffez les échantillons à 95°C pendant 5 min
- Centrifuger les échantillons avec une centrifugeuse de paillasse durant 10 s
- Effectuer les dépôts des échantillons dans chaque puit
- Remplir la cuve de tampon de migration

Références produits :

Bleu de bromophénol : Sigma B8026
 β -mercaptoéthanol : Sigma M7154
 Glycérol : Sigma G 5516

Référence matériel :

Mini-trans Blot electrophoretic transfer cell: Biorad 170-3930

Migration :

1. 60 V le temps que les dépôts sortent des puits et parviennent au gel de séparation
2. 90V pendant environ 2h en fonction des protéines d'intérêt

Fiche technique n°25: Transfert

Principe du transfert :

Le principe est le même que celui de l'électrophorèse. Après l'électrophorèse, les protéines sont toujours fixées par le SDS et donc chargées négativement. En les plaçant de nouveau sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont pouvoir alors migrer du gel pour se fixer sur une membrane de nitrocellulose (ou PVDF).

Préparation du gel :

- Démouler le gel
- Enlever le gel de concentration
- Couper le côté en haut à gauche, diagonalement opposé au puit n°1 (poids moléculaire)

Préparation du sandwich :

- Mettre la partie grise vers l'opérateur
- Placer une éponge
- Placer un papier filtre
- Placer le gel
- Placer la membrane de nitrocellulose (0,2 µm)
- Enlever les bulles en faisant rouler une pipette sur l'ensemble
- Placer un papier filtre
- Placer une éponge
- Fermer le sandwich après avoir de nouveau enlever les bulles

Mise en place :

- Placer le sandwich dans le support (côté noir vers le noir – cathode)
- Placer le support dans la cuve rempli de tampon de transfert
- Laisser migrer en chambre froide durant 1h30 à 100 V ou toute une nuit à 30V

Préparation du tampon de transfert :

- Tampon de transfert (TT) (5x)
 - Tris base : 12 g
 - Glycine : 57,6 g
 - SDS : 0,4 g
 - QSP H₂O 800 mL

A diluer 5 fois, soit pour 1 L de transfert 1X :

- 200 mL de TT 5x
- 200 mL de méthanol (20%)
- QSP H₂O 1 L

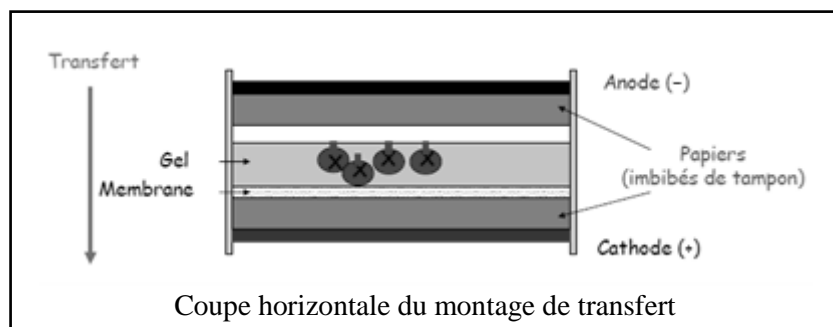
Le tampon de transfert doit être préparé et conservé au minimum 2h à 4°C avant le transfert si celui-ci s'opère à 100V.

Références produits :

Membrane nitrocellulose 0,2 µm ou 0,45 µm selon les protéines d'intérêt : Biorad 162-0112 /162-0115

Références matériel:

Système transfert : Biorad Mini Trans-Blot cell



Fiche technique n°26 : Blocage de la membrane

Principe du blocage : Le blocage de la membrane permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Il consiste à plonger la membrane dans une solution de BSA ou de lait en poudre sans matières grasses. Sans cette procédure, les anticorps appliqués lors de l'étape suivante se fixeraient partout sur la membrane nitrocellulose.

Coloration au rouge ponceau :

- Colorer la membrane en l'incubant quelques secondes dans le rouge Ponceau
- Visualiser la membrane et vérifier que le transfert s'est bien déroulé

Rinçage de la membrane :

- Pour une membrane de 40 cm², laver 2 à 3 fois pendant 10 minutes dans 10 mL de TBS-T (ou PBS-T) 0,05% en agitation jusqu'à une disparition totale du marquage au rouge Ponceau

Blocage :

- Incuber la membrane 1 heure à température ambiante dans les tampons de blocage suivants (selon la protéine d'intérêt) :
 - TBS-T (PBS-T) 0,05% - Lait (5 à 10% selon les anticorps et protéines)
 - TBS-T (PBS-T) 0,05% - BSA (1 à 5%)

Préparation des tampons de lavage :

- TBS 10x, pH 7,4

- Tris base : 30 g
- NaCl : 80 g
- QSP H₂O distillée 1 L
- Ajuster le pH à 7,4 avec HCl

- PBS 10x, pH 7,5

- NaCl : 80 g
- Na₂HPO₄ : 11,5 g
- KCl : 2 g
- KH₂PO₄ : 2 g
- QSP H₂O distillée 1 L
- Ajuster le pH à 7,5 avec NaOH

- TBS-T ou PBS-T 1x (0,05%)

- TBS ou PBS 10 x : 100 ml
- QSP H₂O à 1 L
- Ajouter 500 µl de Tween 20

Intérêts de la coloration au rouge Ponceau :

Le rouge Ponceau est un marqueur chargé négativement qui va se fixer sur les acides aminés chargés positivement composant les protéines. L'usage du rouge Ponceau permet de se rendre compte si la migration des protéines dans le gel s'est fait correctement, mais également si le transfert s'est bien effectuée sur la membrane.

Références produits :

Rouge ponceau : Sigma Fluka P7170
 Lait écrémé : Régilait
 Tween 20 : Sigma P 1379
 Na₂HPO₄ : Prolabo 28.028.298
 KCL : Sigma P9333
 KH₂PO₄ : Sigma P5379

Fiche technique n°27 : Incubation avec les anticorps primaires et secondaires

Principe de l'incubation avec l'anticorps primaire:

La membrane de nitrocellulose contient l'ensemble des protéines de l'extrait cellulaire, il faut mettre en évidence spécifiquement la protéine recherchée. La meilleure méthode pour caractériser une protéine au milieu d'autres protéines est l'immuno-marquage. La protéine joue le rôle d'un antigène face à des anticorps spécifiques (AC primaires) de cette protéine.

Incubation avec l'anticorps primaire :

- Diluer les AC selon la concentration recommandée pour chacun d'entre eux dans 10 ml de solution de blocage spécifique à chaque AC (BSA ou Lait à différentes concentrations)
- Déposer la solution contenant l'AC sur la membrane
- Laisser incubé toute la nuit à 4°C sous agitation

Lavage de la membrane :

- 3 lavages rapides de 5 minutes dans 10 ml dans la solution de lavage spécifique (TBS-T ou PBS-T 0,05%)

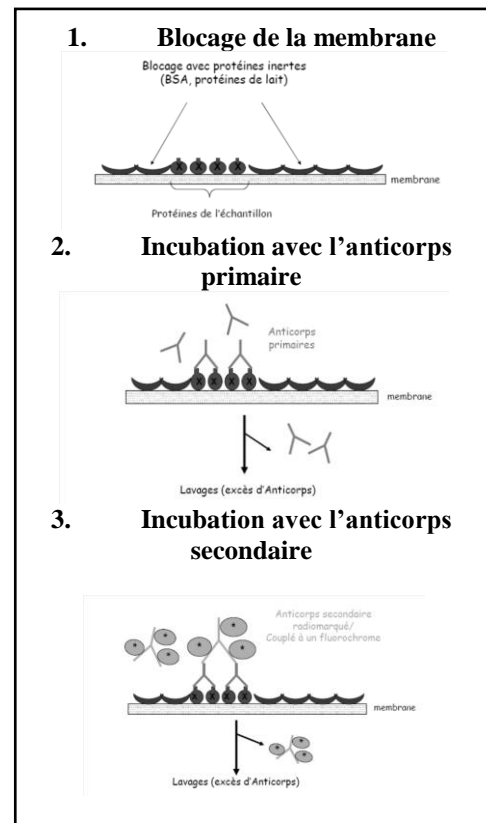
Principe de l'incubation avec l'anticorps secondaire: Une fois le complexe antigène-anticorps formé, il faut le détecter. Cette étape se fait grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) qui détecte les emplacements où des anticorps primaires se sont fixés sur des antigènes ancrés à la membrane. L'anticorps secondaire est choisi en fonction de sa capacité à reconnaître une classe spécifique d'immunoglobulines (IgG) de l'espace animal d'où provient l'anticorps primaire.

Incubation avec l'anticorps secondaire :

- Diluer les AC selon la concentration recommandée pour chacun d'entre eux dans 10 ml de solution de blocage spécifique à chaque AC (BSA ou Lait à différentes concentrations)
- Déposer la solution contenant l'AC secondaire sur la membrane
- Laisser incubé 1h à température ambiante sous agitation

Lavage de la membrane :

- 3 lavages rapides de 5 minutes dans 10 ml dans la solution de lavage spécifique (TBS-T ou PBS-T 0,05%)



Références anticorps secondaires

Donkey anti-goat IgG : SantaCruz Sc-2020
 Goat anti-mouse IgG:P0447 (Dako)
 Goat anti-rabbit IgG: P0448 (Dako)

Fiche technique n°28 : Informations sur les anticorps primaires utilisés

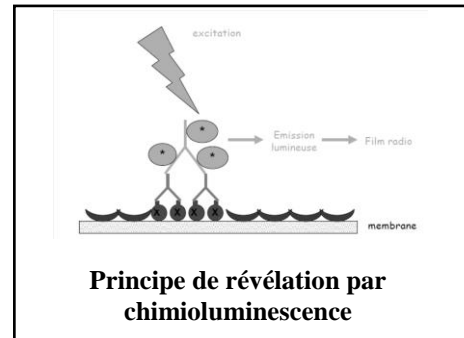
Protéine	Poids (kDa)	Dilution	Source	Société	Références
Catalase	61	1 :5000	Mouse	Sigma	C0979
COX I	36	1 :1000	Mouse	Mitosciences	MS404
COX II	21	1 :200	Donkey	Santa Cruz	Sc-23983
CuZn-SOD	25	1 :5000	Rabbit	NovusBio	19301
Cytochrome c	11	1 :5000	Mouse	Santa Cruz	Sc-13156
DNPH (Protéines carbonylées)		1 : 100	Rabbit	Millipore	S7150
IKK α	85	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	2682
I κ B α	39	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	4812
Mn-SOD	25	1 :5000	Rabbit	Assay Design	SOD-110
Myf-5	32	1 :200	Rabbit	Santa Cruz	Sc-302
Myo-D	38	1 :200	Rabbit	Santa Cruz	Sc-760
Myogenine	50	1 :200	Rabbit	Santa Cruz	Sc-576
Myostatine	38	1 :1000	Rabbit	AbCam	Ab-50097
NF- κ B p65	65	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	3034
NRF-1	68	1 :200	Rabbit	Santa Cruz	Sc-23624
p21	21	1 :200	Rabbit	Abcam	Ab-7960
P38 MAPK	43	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	9212
PGC-1 α	91	1:1000	Rabbit	Cayman	101707
Phospho-P38 MAPK	43	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	9211
Phospho-IKK α	85	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	2697
Phospho-I κ B α	39	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	5210
Phospho-NF- κ B p65	65	1 :1000	Rabbit	Cell Signaling	3033
Protéines poly-ubiquitinées		1 :100	Mouse	Calbiochem	ST1200
α -actine	42	1 :700	Mouse	Sigma	A2172

Fiche technique n°29 : Révélation par chimioluminescence

Principe de la chimioluminescence :

L'anticorps secondaire anti-IgG est lié ou conjugué de manière covalente à l'enzyme HorseRadish Peroxidase (HRP) et c'est en fait l'activité enzymatique de la HRP qui sera détectée grâce à une méthode de chimioluminescence améliorée pour trouver la position des complexes antigène-anticorps. La luminescence est l'émission de lumière résultant de l'énergie émise par une substance qui passe de l'état excité à un état fondamental. En chimioluminescence, cette excitation est provoquée

par une réaction chimique. Le kit de révélation que nous utilisons, ECL (Enhanced Chemiluminescence - Chimioluminescence amplifiée) permet la formation enzymatique d'un ester d'acridinium, lequel est dégradé en un composé excité qui libère son énergie sous forme lumineuse à une longueur d'onde maximale de 430 nm afin de pouvoir retourner à son état fondamental.



Références produits

Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit : RPN1235

Procédure de révélation :

- Mélanger 4 ml de solution A et 4 ml de solution B du kit ECL. Conserver à l'abri de la lumière jusqu'à la révélation
- La membrane est incubée dans la préparation ECL pendant 30 secondes puis les anticorps liés sont détectés par chimioluminescence. L'image révélant la chimioluminescence est enregistrée à l'aide d'une caméra Fuji LAS 3000IR CCD, et les signaux spécifiques sont quantifiés à l'aide du logiciel ImageGauge.

Fiche technique n°30: Immunoprécipitation

Protocole d'homogénéisation :

- Homogénéiser 100 mg de tissu musculaire dans 1 de tampon de lyse (TLT). Remonter et descendre 15 fois le potter en rotation dans l'Eppendorf. Laisser reposer l'échantillon sur glace durant 30 min
- Centrifuger 12000G durant 10 min à 4°C
- Prélever le surnageant dans un Eppendorf de 1,5 ml
- Utiliser la méthode de Lowry puis égaliser les concentrations de chaque tube avec le TLT afin d'obtenir une concentration 1 mg/ml.

Protocole d'immunoprécipitation :

Fixation de l'anticorps aux Dynabeads

- Resuspendre les Dynabeads par agitation (30 s)
- Transférer 50 µl de Dynabeads dans un tube, le placer sur l'aimant et retirer du surnageant
- Retirer le tube de l'aimant et resuspendre les Dynabeads dans 200 µl de tampon de rinçage contenant l'anticorps d'intérêt ou l'IgG correspondante (1 à 10 µg)
- Incuber 10 min en rotation à température ambiante
- Placer le tube sur l'aimant et retirer le surnageant
- Retirer le tube de l'aimant et resuspendre les Dynabeads dans 200 µl de tampon de rinçage

Immunoprécipitation avec l'antigène

- Placer le tube sur l'aimant et retirer le surnageant
- Ajouter 250 µl de l'échantillon dans le tube avec l'anticorps et 250 µl avec l'IgG
- Incuber 10 min en rotation à température ambiante
- Placer le tube sur l'aimant et retirer le surnageant
- Retirer le tube de l'aimant et nettoyer les Dynabeads 3 fois dans 200 µl de tampon de rinçage (agiter en pipetant doucement)
- Resuspendre les Dynabeads dans 100 µl de tampon de rinçage et transférer la suspension dans un nouveau tube. le tube sur l'aimant et retirer le surnageant

Elution du complexe anticorps/antigène

- Diluer au 1/3 dans du PBS le tampon de dépôt 3X et ajouter 30 µl de ce tampon avec le tube contenant les Dynabeads
- Chauffez les échantillons à 95°C pendant 10 min
- Placer le tube sur l'aimant, prélever le surnageant pour le charger dans le gel d'électrophorèse

Tampon de lyse (pour 50 ml) :

- 60,57 mg de Tris Base
- 4,27 g de sucrose
- 146 mg NaCl
- 93 mg EDTA
- 333 mg de pyrophosphate de sodium

Le jour de l'homogénéisation, ajouter :

- 500 µl de NP40
- 125 mg de sodium deoxycholate
- 250 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéases
- 105 de NaF
- 25 µl d'orthovanadate de sodium

Système Dynabeads



Références produits :

Ubiquitine aldehyde : Santa Cruz sc-4316
 MG132 : Calbiochem 474790
 DynaMag™-2 magnet: Introvigen 123-21D
 Immunoprecipitation Kit -Dynabeads® Protein A: Introvigen 100-06D
 Mouse anti-IgG :Santa Cruz sc2343
 Rabbit anti-IgG : Santa Cruz sc2345

Fiche technique n°31: Fixation du complexe NF-κB à l'ADN

Principe : La fixation du facteur NF-κB sur l'ADN est déterminée par un kit ELISA (TransAM, Active Motif). Cette technique est une alternative à la technique de retard sur gel. Elle a l'avantage d'être plus sensible et de ne pas nécessiter l'utilisation de radio-isotopes. Le kit contient une plaque de 96 puits tapissés d'oligonucléotides contenant la séquence consensus de NF-κB p65. La forme active de NF-κB des échantillons déposés dans chaque puit va alors se fixer spécifiquement à cet oligonucléotide. L'ajout d'un anticorps primaire permet ensuite de reconnaître l'épitope de NF-κB p65 uniquement lorsqu'il est fixé à l'ADN. Un anticorps secondaire marqué à l'HRP est finalement ajouté fournissant un signal chimioluminescent quantifiable et proportionnel à l'activité de NF-κB p65.

Protocole d'homogénéisation : Le protocole pour extraits nucléaires est utilisé dans le cadre de cette analyse (Fiche technique n°21).

Fixation du NF-κB à la séquence consensus :

- Effectuer une gamme de 0,5 à 0 ng/μL de NF-κB p65 recombinant à partir d'une solution de 100 ng/μL. Effectuer les dilutions dans le Complete Lysis Buffer.
- Ajouter 30 μl de tampon de fixation dans chaque puit.
- Ajouter 20 μg de l'extrait nucléaire dans une solution de 20 μl. Ajouter également la gamme et un échantillon blanc avec seulement 20 μl de tampon de lyse.
- Recouvrir la plaque de parafilm et incuber une heure à température ambiante sur une plate-forme rotative.
- Laver 3 fois avec 200 μl de tampon de lavage. Pour chaque lavage, taper la plaque à l'envers pour vider complètement les puits.

Fixation des anticorps primaire et secondaire :

- Ajouter 175 μl du tampon pour anticorps contenant l'anticorps secondaire et incuber 1h à température ambiante sans agitation. Durant cette incubation, préparer la solution chimioluminescente afin qu'elle soit à température ambiante pour la révélation.
- Laver 4 fois avec 200 μl de tampon de lavage.

Révélation :

- Ajouter 100 μl de solution chimioluminescente dans chaque puit et incuber durant 3 minutes
- Ajouter 100 μl de la solution Stop puis lire l'absorbance avec un lecteur spectrophotométrique à une longueur d'onde de 450 nm.

Tampons utilisés :

Tampon de lyse (22,5 μl/puit)

- 0,11 μl de DTT
- 0,23 μl de cocktail d'inhibiteur de protéases
- 22,2 μl de Lysis Buffer AM2

Tampon de fixation (33,8 μl/puit)

- 0,07 μl de DTT
- 0,34 μl de Herring Sperm DNA
- 33,4 μl de Binding Buffer AM3

Tampon de lavage 1X (2,025 ml/puit)

- 2,025 ml d'eau Bi-distillée
- 225 μl de Washing Buffer 10X

Tampon pour anticorps 1X (175 μl/puit)

- 107,5 μl d'eau Bi-distillée
- 17,5 μl de 10X Antibody Binding Buffer
- 50 μl d'anticorps primaire ou secondaire

Solution chimioluminescente (56,2 μl/puit)

- 37,5 μl de Reaction Buffer
- 18,7 μl de Chemiluminescent Reagent

Références produits :

TransAM™ NFκB p65 : Active Motif 40096

Recombinant NF-κB p65 : Active Motif 31102

Référence matériel :

Spectrophotomètre : Lecteur Microplaque 3 en 1 (Biotek Synergy HT)

Pipette multicanaux : ThermoScientific

Chapitre 2 : Liste des figures et tableaux

Liste des encadrés

<i>Encadré 1. Détermination de la typologie musculaire</i>	<i>25</i>
<i>Encadré 2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie.....</i>	<i>38</i>
<i>Encadré 3. Les espèces réactives.....</i>	<i>45</i>
<i>Encadré 4. Sources d'ERDO dans le tissu musculaire</i>	<i>47</i>
<i>Encadré 5. Systèmes antioxydants</i>	<i>50</i>
<i>Encadré 6. Marqueurs des dommages oxydatifs</i>	<i>54</i>
<i>Encadré 7. Stress oxydant associé au vieillissement et à l'inactivité.....</i>	<i>55</i>
<i>Encadré 8. Voies de signalisation impliquant NF-κB</i>	<i>60</i>
<i>Encadré 9. Régulation de la biogénèse mitochondriale par PGC-1α.....</i>	<i>71</i>

Liste des figures

<i>Figure 1. Spirale du déconditionnement</i>	<i>8</i>
<i>Figure 2. Modèle d'immobilisation chez les rongeurs.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 3. Schéma des mécanismes principaux impliqués dans la sarcopénie</i>	<i>32</i>
<i>Figure 4. Voies de signalisation simplifiée de l'apoptose dans le tissu musculaire</i>	<i>34</i>
<i>Figure 5. Modèle de parabiose hétérochronique</i>	<i>36</i>
<i>Figure 6. Représentation schématique des différentes voies d'activation de PGC-1α suggérées au sein du tissu musculaire.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 7. Rôle protecteur de l'exercice suggéré pour limiter la dégradation protéique via la stimulation de PGC-1α</i>	<i>72</i>
<i>Figure 8. Schéma d'activation de la p38 MAPK par les ERDO</i>	<i>75</i>
<i>Figure 9. Modèle d'activation de NF-κB par l'inactivité musculaire proposé par Hunter et al. (2002)</i>	<i>154</i>
<i>Figure 10. L'atténuation des réponses de signalisation intracellulaire à l'activité contractile dans le muscle âgé s'expliquerait par la surproduction chronique d'ERDO</i>	<i>159</i>
<i>Figure 11. Espiral de la fragilidad.....</i>	<i>165</i>
<i>Figura 12. Esquema de los principales mecanismos implicados en la sarcopenia</i>	<i>166</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Suggestions de catégorisation de la sarcopénie par l'EWGSOP (Cruz-Jentoft et al. 2010)</i>	<i>15</i>
<i>Tableau 2. Mesures de la masse, de la force musculaire et de la performance chez l'homme et le rongeur</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 3. Seuils de performance pour le diagnostic de la sarcopénie chez les personnes âgées.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 4. Réduction avec l'âge, exprimée en pourcentage, de la taille des fibres musculaires chez l'homme ...</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 5. Modifications avec l'âge de la force musculaire des muscles extenseurs.</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 6. Effets du vieillissement sur le contenu en cellules satellites chez l'homme.....</i>	<i>36</i>

Chapitre 3 : Publications et communications

Publications relatives au travail de thèse

Derbre F, Gomez-Cabrera MC , Nascimento AL, Sanchis-Gomar F , Martinez- Bello VE , Tresguerres J, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Viña J. Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise. Age (Dordr). 2011 May 18. [Epub ahead of print]

Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC , Sanchis-Gomar F , Martinez- Bello VE, Gratas-Delamarche A, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents muscle atrophy and NF- κ B activation during hindlimb unloading. Soumis dans le Journal of Physiology.

Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Gratas-Delamarche A, Viña J. Inactivity-induced oxidative stress: A central role in age-related sarcopenia? Invitation à une revue de questions dans l'European Journal of Sport Science.

Communications en congrès internationaux

Derbré F, Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Martinez-Bello VE, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Delamarche P, Gratas-Delamarche A, Viña J. Skeletal muscle regeneration during aging and physical exercise : role of oxidative stress and myostatin. 15th Annual Congress of the European College of Sport Science, Antalya, Turquie, 23-26 juin 2010. **Prix Jeune Chercheur de meilleure communication orale**

Derbré F, Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Martinez-Bello VE, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Delamarche P, Gratas-Delamarche A, Viña J. Endurance training fails to stimulate mitochondrial biogenesis in aged skeletal muscle rats. 3th Symposium Nutrition Oxygen Biology and Medicine, Paris, 8-10 avril 2009. **Prix Jeune Chercheur de la meilleure communication orale**

Derbré F, Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Martinez-Bello VE, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Delamarche P, Gratas-Delamarche A, Viña J. Age-related deficiency in activation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle : role of PGC-1 α . FEBS/SFRR-E/IUBMB Advanced Lecture Course, Spetses Island, Grèce, 4-10 juin 2010. *Poster commenté oralement.*

Derbré F, Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Martinez-Bello VE, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Delamarche P, Gratas-Delamarche A, Viña J. Short-term endurance training fails to reduce oxidative stress and to up-regulate myogenic regulator factors in aged skeletal muscle. 35th Congress, of Spanish Society of Physiological Sciences, Valence, Espagne, 17-20 février 2009. *Poster commenté oralement.*

Derbré F, Gómez-Cabrera MC, Domenech E, Martinez-Bello VE, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Gratas-Delamarche A, Viña J. Short-term endurance training failed to stimulate the antioxidant capacity and the mitochondriogenic pathway in skeletal muscle in aged rats. 30th FIMS World Congress of Sports Medicine, Barcelone, Espagne, 18- 23 novembre 2008. *Poster commenté oralement.*

Communications en congrès nationaux

Derbré F, Ferrando B, Martinez-Bello VE, Sanchis-Gomar F, Garcia-Valles R, García-López E, Ibañez S, Brioché T, Gomez-Cabrera MC, Gratas-Delamarche A, Viña J. Benefits of allopurinol treatment to prevent muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Congrès P2T, Grenoble, 22-24 mars 2011. *Communication orale*.

Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez- Bello VE, Tresguerres J, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Viña J. Rôle de PGC-1 α dans les altérations de la biogénèse mitochondriale au sein du tissu musculaire âgé. 14^{ème} congrès de l'ACAPS, Rennes, 24-26 octobre 2011. *Communication orale*.

Résumé

La sarcopénie est considérée comme un syndrome gériatrique se caractérisant par une diminution de la masse musculaire qui en s'aggravant sera à l'origine d'une détérioration de la force musculaire et des performances physiques. La sarcopénie est évidemment imputable au processus de vieillissement, mais son développement peut être accéléré sous l'effet de facteurs pathologiques et comportementaux. Depuis un siècle à peine, le comportement de l'homme moderne, en matière d'activité physique, a radicalement changé avec un mode de vie de plus en plus inactif. Cette inactivité chronique est apparue trop soudainement pour permettre à notre génotype de s'adapter, et contribue ainsi à accélérer le développement de la sarcopénie. Néanmoins, des interrogations subsistent concernant les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels l'inactivité physique favoriserait ce syndrome gériatrique.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de déterminer certains de ces mécanismes en se centrant tout particulièrement sur le rôle des espèces dérivées de l'oxygène (ERDO). En s'appuyant sur différents modèles expérimentaux d'activité (entraînement en endurance) et d'inactivité (suspension par la queue) chez le rongeur, nos travaux ont mis en évidence le rôle essentiel de la surproduction chronique d'ERDO (qu'elle soit liée à l'âge et/ou l'inactivité) dans l'activation de certains facteurs de transcription et kinases redox-sensibles impliqués dans la sarcopénie (i.e. NF- κ B, p38 MAPK). Nos travaux démontrent également que l'avance en âge (et probablement l'inactivité chronique) induit une perte de réactivité de PGC-1 α , un facteur de transcription redox-sensible régulant un certain nombre de mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie. Cette perte de réactivité pourrait s'expliquer par la surproduction chronique d'ERDO dans le muscle âgé.

Mots-clés: sarcopénie, stress oxydant, vieillissement, inactivité, muscle, PGC-1 α , NF- κ B

Abstract

Aging causes a progressive decline in skeletal muscle mass that may lead to decreased strength and functionality. The term sarcopenia is especially used to characterize this geriatric syndrome. Numerous conditions and behaviors are considered to accelerate the progression of sarcopenia such as chronic diseases, malnutrition and physical inactivity. In millennia past, and until recently, among hunter-gatherers and like populations, down through the ages, all people were physically very active during early life and later in their everyday occupations. In contrast, nowadays, in Western populations, with relative abundance of food, a sedentary lifestyle is the rule. This radical change in lifestyle counteracts our active phenotype, and thus promotes the development of sarcopenia. Despite the recent advances in the etiology of sarcopenia, some questions remain concerning the cellular and molecular mechanisms by which the physical inactivity promotes sarcopenia.

Consequently, the aim of this thesis was to determine some of these mechanisms, and more especially the role played by reactive oxygen species (ROS). We used different experimental rodent models of activity (physical training) and inactivity (hindlimb suspension) to achieve these objectives. Our research underlines the essential role of age or/and inactivity related chronic ROS overproduction in the activation of redox-sensitive transcription factors and kinases involved in sarcopenia (i.e. NF- κ B and p38 MAPK). We also demonstrated that aging (and probably lifelong inactivity) induces a loss of PGC-1 α reactivity, a key redox-sensitive transcription factor regulating some cellular mechanisms involved in sarcopenia. Chronic ROS overproduction in aged skeletal muscles may explain this loss of PGC-1 α reactivity.

Keywords: sarcopenia, skeletal muscle, oxidative stress, aging, inactivity, PGC-1 α , NF- κ B



Laboratoire "Mouvement, Sport, Santé"

Avenue Charles Tillon - CS 24414 – 35044 Rennes Cedex

Tél : + 33(2) 99 14 17 75 Fax : + 33(2) 99 14 17 74